

На правах рукописи

**СКОРИНКИН Андрей Иванович**

**МЕХАНИЗМЫ МОДУЛЯЦИИ РАБОТЫ  
ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА И АТФ**

03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Казань – 2008

Работа выполнена в Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина (лаб. биофизики, зав. лаб. д.ф.-м.н., ст.н.с. Котов Н.В.)  
и в Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН  
(лаб. биофизики синаптических процессов,  
зав. лаб. чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор Е.Е. Никольский)

Научный консультант  
доктор медицинских наук, профессор Р.А. Гиниатуллин

Официальные оппоненты:  
Доктор физико-математических наук К.Б. Асланиди  
Доктор биологических наук С.С. Колесников  
Доктор биологических наук Д.Б. Тихонов

Ведущее учреждение – Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН

Защита состоится “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2008 г. в “\_\_\_\_\_” часов на  
заседании специализированного совета Д 002.093.01 при Институте теоретической  
и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пущино, Московская  
область, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института.

Автореферат разослан “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат физико-математических наук

Н.Ф. Ланина.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Исследование механизмов модуляции процесса межклеточной передачи электрических сигналов в нервной системе представляет собой одну из актуальных проблем современной нейрофизиологии. Без глубокого изучения этих механизмов невозможно понять фундаментальные свойства синаптической пластичности в нервной системе и оказать целенаправленное воздействие на синаптическую передачу.

Постсинаптическая мембрана, содержащая ионотропные рецепторы для разных нейротрансмиттеров, представляет собой одну из мишеней для действия эндогенных и экзогенных синаптических модуляторов. На постсинаптическом уровне синаптическая пластичность определяется состоянием рецепторно-канальных комплексов, кинетика активации которых выделяющимся из нервного окончания медиатором определяет амплитудно-временные параметры постсинаптического ответа. Физиологически активные соединения, многие из которых применяются в клинической практике, могут модифицировать состояние рецепторно-канального комплекса посредством разных механизмов воздействия как на сам комплекс, так и на его липидное окружение (Changeux et al., 1998; Ralevic and Burnstock, 1998; Quick and Lester, 2002; North, 2002). Понимание молекулярных механизмов взаимодействия физиологически активных соединений с рецепторно-канальными комплексами постсинаптической мембраны необходимо для более эффективного прогнозирования последствий действия этих соединений на состояние синаптической передачи при различных режимах работы нервно-мышечного аппарата.

Модуляция синаптической передачи на постсинаптическом уровне в физиологических условиях или ее нарушение при патологических процессах в нервной системе может реализоваться за счет нескольких принципиально разных механизмов. Главными постсинаптическими ингибиторными механизмами, относительно хорошо изученными на примере рецепторов, активируемых глутаматом, ГАМК или ацетилхолином, являются блокада активного центра рецептора или его ионного канала, десенситизация и аллостерическая модуляция (Гиниатуллин, Магазаник, 1998; Colquhoun, 1998; Tikhonov, Magazanik, 1998; Quick, Lester, 2002; North, 2002, 2004; Zhorov, Tikhonov, 2004; Changeux, Edelstein, 2005). Тем не менее, даже для этих давно и хорошо изученных рецепторов молекулярные механизмы процессов блокады, десенситизации и аллостерической модуляции во многом остаются недостаточно исследованными. Наиболее же слабо изученной является модуляция относительно недавно открытых ионотропных рецепторов, активируемых внеклеточным АТФ (Ralevic, Burnstock, 1998).

Несмотря на известное деление антагонистов рецепторов на «конкурентные» и «неконкурентные», а агентов, взаимодействующих с ионным каналом – на блокаторы открытого и закрытого ионного канала, не существует общепризнанной всеохватывающей классификации антагонистов. Ситуация усложняется тем, что многие антагонисты одновременно проявляют черты блокаторов разных типов, взаимодействуя, по-видимому, с различными сайтами одного рецептора (Colquhoun, 1981). Мало изучены так называемые блокаторы открытого канала ловушечного типа, способные оставаться в ионном канале при его закрытии (Lingle, 1983; Gurney, Rang, 1984). В первых кинетических моделях ловушечного механизма блокады (Lingle, 1983; Blanpied et al., 1997) предполагалось, что

рецептор с находящимся в канале блокатором имеет такую же аффинность к агонисту и динамику открытия-закрытия канала, как и рецептор без блокатора. Но позднее появились работы (Dilmore, Johnson, 1998; Giniatullin et al., 2000), указывающие на возможное изменение свойств рецептора в заблокированном состоянии.

К настоящему времени описаны три принципиальные модели процесса десенситизации ионотропных рецепторов: циклическая (Katz, Thesleff, 1957; Auerbach, Akk, 1998; Dudel, Heckmann, 1999), дивергентная (Jones, Westbrook, 1995; Jones et al., 1998) и последовательная (Rettinger, Schmalzing, 2003). Во многих случаях основания для выбора между этими моделями неясны, поскольку не установлены принципиальные различия и ограничения этих моделей. Кроме того, используются схемы десенситизации, включающие в себя черты сразу нескольких моделей (Burkat et al., 2001; Dilger, 2002; Elenes, Auerbach, 2002; Robert, Howe, 2003; Celentano, Hawkes, 2004), что еще более затрудняет анализ механизмов.

Известно, что некоторые модуляторы ионных каналов осуществляют свой эффект через липидную фазу клеточной мембраны (Trudell, Bertaccini, 2002). Можно ожидать, что такой модулятор может специфически блокировать ионный канал или аллостерически модулировать работу рецептора через липид-зависимый центр связывания или неспецифически менять свойства самой мембраны (Bouzat, Barrantes, 1996; Arias, 1998; 1999). Характерным свойством этой группы веществ, действующих через липидную фазу, во многих случаях является медленная обратимость их эффекта (Anderson, 1993; Kukita, Mitaku, 1993; Ha, Fryer, 1997). Раскрытие механизмов, обуславливающих длительную модуляцию постсинаптических токов, актуально как для фундаментальной нейрофизиологии, так и для практической медицины, так как даст основания для целенаправленного поиска фармакологических препаратов, обеспечивающих надежное повышение или понижение эффективности синаптической передачи за счет влияния на кинетику и чувствительность постсинаптических рецепторов.

Поскольку одним из ведущих механизмов обеспечения синаптической пластичности на постсинаптическом уровне является модуляция амплитудно-временных характеристик постсинаптических ответов, которая определяется параметрами активации рецепторно-канальных комплексов хеморецептивной мембраны, то для эффективной оценки изменения пластических свойств синаптического контакта при действии различных физиологически активных веществ необходима разработка алгоритма, позволяющего по определенным признакам классифицировать ингибиторы постсинаптического типа действия как блокаторы, ускорители десенситизации или аллостерические модуляторы. Для разработки такого алгоритма необходимо сопоставить экспериментальные и модельные параметры активации рецепторно-канальных комплексов при действии ряда веществ, применяемых в клинической практике и обладающих постсинаптическими эффектами.

**Цель и основные задачи исследования.** Целью настоящего исследования является выяснение механизмов ингибирования ионотропных рецепторов, активируемых ацетилхолином и АТФ.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Исследование эффектов применяемых в клинической практике веществ

мекамиламина, хлоргексидина, демифосфона и иных производных 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты на функционирование никотиновых холинорецепторов мышечного и нейронального ( $\alpha_3\beta_4$ ) типов.

2. Исследование механизма действия ионов водорода на функционирование ионотропных рецепторов АТФ.

3. Исследование механизмов десенситизации ионотропных рецепторов АТФ.

4. Создание кинетических моделей, описывающих функцию рецепторов, активируемых ацетилхолином и АТФ, и механизмы действия постсинаптических ингибиторов разного типа.

5. Разработка алгоритма, позволяющего выявить молекулярный механизм действия ингибиторов постсинаптического типа (конкурентный антагонист, неконкурентный антагонист, блокатор «ловушечного» типа, аллостерический модулятор).

**Научная новизна.** Впервые проведен комплексный (экспериментальный и модельный) анализ различных механизмов ингибирования ионотропных холинорецепторов и рецепторов АТФ и разработана концепция различения механизмов депрессии трансмембранных токов. Кроме того, впервые получен ряд более частных научных результатов. Так, впервые получены экспериментальные доказательства того, что наличие блокатора в закрытом канале холинорецептора меняет динамику открытия-закрытия этого канала. Показано, что ингибиторная равновесная константа для каналоблокаторов зависит от концентрации агониста, что ранее не учитывалось при сравнении их действия. Впервые показан двойной – каналоблокирующий и аллостерический – механизм действия ряда модуляторов холинорецепторов. Впервые установлено, что повышение ионами водорода аффинности ионотропных  $P2X_2$  рецепторов АТФ может приводить к разнонаправленным эффектам – активирующему или ингибирующему, в зависимости от действующей концентрации агониста. Предложен молекулярный механизм этих эффектов, заключающийся в наличии агонистзависимого инактивированного состояния у  $P2X_2$  рецепторов, придающего специфические свойства этому подтипу рецепторов. Показано, что подпороговые концентрации АТФ, не вызывающие активации рецепторов, способны прямо переводить ионотропные рецепторы АТФ подтипа  $P2X_3$  в десенситизированное состояние. Впервые показано, что скорость восстановления этих рецепторов после десенситизации зависит от типа и концентрации вызвавшего десенситизацию агониста.

**Научно-практическая ценность.** Основное значение проведенного исследования состоит в получении набора экспериментальных критериев, позволяющих различить механизмы ингибирующего действия биологически активных веществ на синаптическую передачу. Известно, что ингибиторные эффекты с разным механизмом действия часто бывают сходны и необходимо найти экспериментальные условия, при которых различия в механизмах могли бы проявиться. Так, для всех веществ, взаимодействующих с открытым ионным каналом, характерна зависимость скорости и степени их действия от частоты открывания каналов. Такая зависимость от активации отсутствует у аллостерических модуляторов, взаимодействующих с местами связывания на внешней части рецепторно-канального комплекса, их эффект зависит только от

времени действия вещества и может развиваться даже в отсутствие агониста, то есть при закрытых ионных каналах. На развитие эффекта аллостерических модуляторов и его ослабление при отмывании вещества также не влияет изменение концентрации агониста, которое сильно влияет на развитие эффекта блокаторов каналов и его ослабление при отмывании. Блокаторы каналов ловушечного типа не отмываются в отсутствие агониста, т.е. без открывания заблокированных каналов. Проверка эффектов в указанных экспериментальных условиях вместе с анализом времени спада вызываемых агонистом ионных токов позволяют однозначно различить механизмы ингибирующего действия веществ на синаптическую передачу.

Некоторые положения работы представляют практический интерес. В частности, получены доказательства того, что часто используемый для оценки действия блокаторов параметр – ингибиторная равновесная константа – зависит от концентрации применяемого для получения трансмембранных токов агониста. Эта зависимость может быть использована для более тонкой характеристики влияния блокаторов на процесс синаптической передачи. Способность низких концентраций агониста переводить  $P2X_3$  рецепторы в десенситизированное состояние может быть использована для разработки анальгетиков нового типа, особенно важных при хронических болях, в патогенез которых вовлечен этот подтип АТФ рецепторов. При сопоставлении механизмов веществ, применяемых в клинической практике (мекамиламина, хлоргексидина, демифосфона) установлено, что они являются блокаторами холинорецепторного комплекса с разными механизмами действия, включающими медленное блокирование открытого ионного канала, блокирование канала по «ловушечному» типу и аллостреческую модуляцию рецепторно-канального комплекса.

Полученные данные о влиянии физиологически активных веществ на кинетику работы рецепторно-канальных комплексов, приводящем к изменению амплитудно-временных параметров многоквантового постсинаптического ответа, могут служить основанием для целенаправленного поиска и синтеза лекарственных препаратов. Особенно перспективными представляются медленно отмывающиеся ингибиторы, способные накапливаться в синапсе и оказывать на него пролонгированное ингибиторное действие.

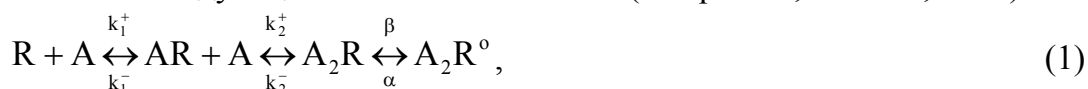
**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на конференциях КГУ (Казань, 1999 – 2006); КИББ КазНЦ РАН (Казань, 2003 – 2006); V, VI, VII и IX Всероссийских школах молодых ученых по актуальным проблемам нейробиологии (Казань, 1998, 1999, 2000, 2005); V и VI Всероссийских научных симпозиумах «Растущий организм: Адаптация к физической и умственной нагрузке» (Казань, 2000, 2002); XI, XII и XIII Всероссийских конференциях по структуре и динамике молекулярных систем (Москва-Казань-Йошкар-Ола, 2004, 2005, 2006); IV Международной конференции по математическому моделированию (Москва, 2000); Международной конференции по синаптической передаче (Рим, 2000); Международной школе по синаптической передаче (Киев, 2000); Международной конференции по синаптогенезу (Вена, 2003); Международной конференции Федерации Европейских биохимических обществ (Брюссель, 2003); III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004); XVIII, XIX и XX Съездах Всероссийского Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Казань, 2001; Екатеринбург, 2004; Москва 2007).

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 280 с., содержит 80 рис., 18 таблиц и состоит из описания использованных в работе материалов и методов исследования, изложения собственных экспериментальных и модельных данных, обсуждения результатов работы и выводов. Список цитированной литературы содержит 313 наименований.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на изолированном нервно-мышечном препарате (седалищный нерв – портняжная мышца) лягушек *Rana ridibunda* и *Rana temporaria*, на хромоафинных клетках надпочечников крыс, клетках феохромоцитомы крыс PC12, сенсорных нейронах крыс и мышей и культуральных мышечных клетках крыс C2C12 по стандартным методикам, подробно описанным в литературе (Волкова и др., 1975; Magazanik et al., 1984; Giniatullin et al., 1996, 1999; Lorenzon et al., 1997; Sokolova et al., 2001). При работе на нервно-мышечном препарате использовался двухэлектродный метод фиксации потенциала, при работе на изолированных клетках – одноэлектродный метод фиксации потенциала. Регистрация и последующее измерение параметров трансмембранных токов осуществлялись с помощью АЦП и компьютерных программ.

Для описания реакций взаимодействия ацетилхолина с холинорецепторами использовалась следующая кинетическая схема (Colquhoun, Hawkes, 1977):



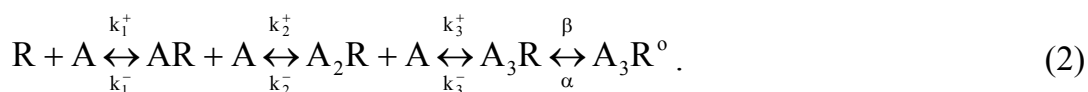
константы скоростей реакций для холинорецепторов мышечного и нейронального ( $\alpha_3\beta_4$ ) типов, взятые из работ (Mathie et al., 1991, Maconochie, Knight, 1992, Bennett et al., 1997; Stiles et al., 1999), приведены в Таб. 1.

Константа скорости закрытия канала холинорецептора является потенциалзависимой и вычисляется по формуле  $\alpha(V) = \alpha(0) \cdot e^{V/H}$ , где  $V$  – мембранный потенциал в мВ,  $H$  – константа потенциалзависимости ( $H = 156$  мВ; Mathie et al., 1990; Maconochie, Knight, 1992); в Таб. 1 приведено значение  $\alpha(-70$  мВ).

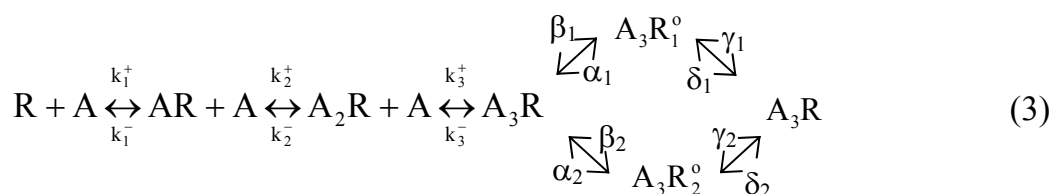
Таблица 1. Константы скоростей реакций для холинорецепторов разных типов.

	$k_1^+,$ ммоль <sup>-1</sup> ·мс <sup>-1</sup>	$k_1^-,$ мс <sup>-1</sup>	$k_2^+,$ ммоль <sup>-1</sup> ·мс <sup>-1</sup>	$k_2^-,$ мс <sup>-1</sup>	$\beta,$ мс <sup>-1</sup>	$\alpha,$ мс <sup>-1</sup>
мышечный тип	160	18	80	36	36.7	1.7
нейрональный тип ( $\alpha_3\beta_4$ )	40.8	4.2	20.4	8.4	0.46	0.03

Для описания реакций взаимодействия АТФ с P2X рецепторами использовалась аналогичная (1) кинетическая схема, но с тремя (Nicke et al., 1998) местами посадки агониста:



Что касается величин констант скоростей реакций, то они пока неизвестны и находились в результате математического моделирования экспериментальных данных. Для одного из подтипов рецепторов АТФ – P2X<sub>2</sub> – была использована кинетическая схема из (Ding, Sachs, 1999) с двумя открытыми состояниями:



На основании любой кинетической схемы можно составить, пользуясь законом действующих масс, систему обыкновенных дифференциальных уравнений вида (Chretien, Chauvet, 1998):

$$\frac{d\bar{P}(t)}{dt} = \mathbf{Q} \cdot \bar{P}(t), \quad (4)$$

где  $\bar{P}(t)$  – вектор вероятностей существования рецептора в разных состояниях,  $\mathbf{Q}$  – матрица переходов между состояниями. Ввиду сохранения общего количества рецепторов на мембране  $\sum \bar{P}(t) = 1$  и количество уравнений в системе (4) должно быть на одно меньше, чем число возможных состояний рецептора. Системы вида (4) решались численно оптимизированным методом Рунге-Кутты 8 порядка (Baker et al., 1996) с помощью самостоятельно написанной на языке «Паскаль» программы. Для сравнения экспериментальных результатов с модельными обычно пользуются предположением, что в каждый момент времени величина тока через мембрану при фиксированном потенциале на ней пропорциональна вероятности нахождения рецептора в состоянии с открытым каналом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние мекамиламина на функционирование никотиновых холинорецепторов.

Мекамиламин – N-2,3,3-тетраметилбихлор [2.2.1] гептан-2-амин – является известным антагонистом некоторых типов нейрональных холинорецепторов (Ascher et al., 1979; Fieber, Adams, 1991; Nooney et al., 1992). Мекамиламин в концентрации 20 мкмоль уменьшал амплитуду токов концевой пластинки (ТКП) в изолированном нервномышечном препарате лягушек до  $28 \pm 2$  % от контрольных значений, а постоянную времени спада ( $\tau$ ) до  $57 \pm 4$  % ( $n = 8$ ;  $P < 0.05$ ; Рис. 1.). Этот эффект оказался слабообратимым, поскольку даже через 40 минут отмывания вещества нормальным физиологическим раствором амплитуда и постоянная времени спада ТКП восстанавливались лишь частично (Рис. 1).

Аппроксимация экспериментальной зависимости амплитуды ТКП от концентрации мекамиламина уравнением Хилла позволила определить концентрацию полумаксимального действия мекамиламина  $IC_{50}$ , эта величина при мембранном потенциале -70 мВ оказалась равна 7.8 мкмоль. Но поскольку эффект мекамиламина сильно зависит от мембранного потенциала,  $IC_{50}$  также зависит от потенциала, что позволяет, аппроксимируя экспериментальные данные уравнением Вудхол (5), найти относительную глубину  $\delta$  сайта связывания мекамиламина в канале холинорецептора мышечного типа у холоднокровных. Найденная таким образом величина  $\delta$  оказалась равна 0.37 (от электрического поля канала), а зависимость  $IC_{50}(V)$  при комнатной температуре ( $T = 295$  °К) выражается формулой:

$$IC_{50}(V) = 21.6 \cdot e^{\frac{0.37 \cdot V}{25.435}}, \quad (5)$$



где  $IC_{50}$  выражается в мкмоль при  $V$  в мВ.

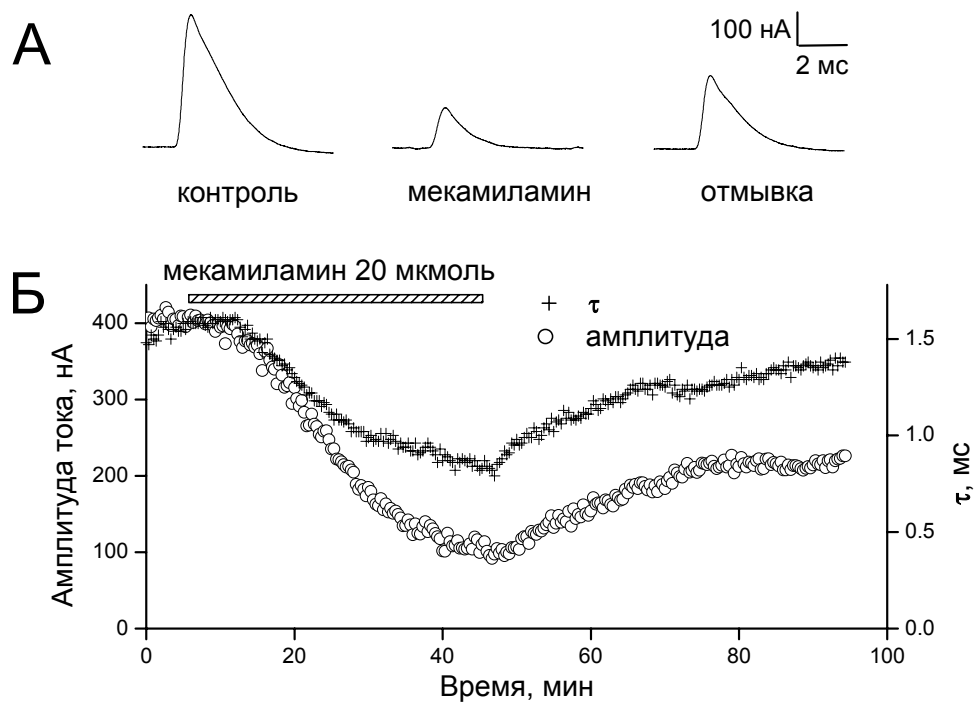
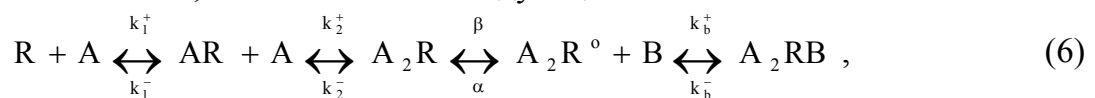


Рис. 1. Действие мекамиламина в концентрации 20 мкмоль на ТКП. А. Образцы ТКП до подачи мекамиламина, через 40 минут действия мекамиламина и через 40 минут отмывания вещества (слева направо). Б. Изменения амплитуды и постоянной времени спада ТКП ( $\tau$ ) в ходе типичного эксперимента.

Для проверки зависимости эффекта от потенциала и активации каналов на фоне действия мекамиламина в концентрации 20 мкмоль (через 30-40 минут после начала подачи) после очередной стимуляции нерва мембрану быстро деполяризовали до -20 мВ на 2 минуты, затем мембранный потенциал возвращали к нормальному уровню -70 мВ. Если во время деполяризации стимуляция нерва продолжалась (с периодичностью 3 раза в минуту или 10 раз в секунду), то амплитуды ТКП после возврата к потенциалу -70 мВ оказывались достоверно больше амплитуд ТКП перед деполяризацией; этот эффект исчезал за 6-8 сигналов. Если во время деполяризации стимуляция нерва прекращалась, то амплитуды ТКП после возврата к потенциалу -70 мВ достоверно не изменялись (Таб. 2). Надо отметить, что в отсутствие мекамиламина амплитуды ТКП не изменялись при обоих вариантах деполяризации.

Для объяснения наблюдаемых эффектов были использованы следующие три модели.

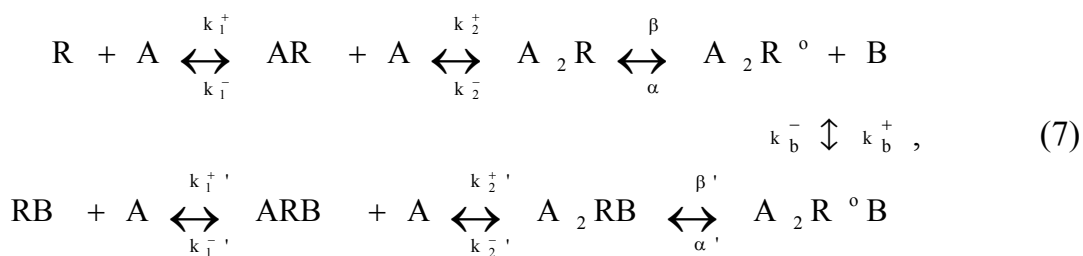
Модель 1. Блок открытого канала – простейшая модель взаимодействия антагониста с ИХР, он описывается следующей кинетической схемой:



где  $B$  – блокатор,  $k_b^+$  и  $k_b^-$  – константы скорости блокирования и деблокирования соответственно,  $A_2RB$  – состояние рецептора с заблокированным каналом. В этой

модели можно воспроизвести требуемый уровень уменьшения амплитуд и постоянных времени спада ТКП под действием мекамиламина в концентрации 20 мкмоль и даже восстановление амплитуд в результате деполяризации при редкой стимуляции (последнее – за счет потенциалзависимости константы  $k_b^-$ ), но в двух других критериях проявляется сильная зависимость этой схемы от частоты (Таб. 2).

Модель 2. Известно, что некоторые блокаторы способны оставаться внутри ионного канала при его закрытии (Lingle, 1983; Gurney, Rang, 1984), то есть попадают в своеобразную ловушку, и для их выхода канал должен опять открыться. Можно предположить, что нахождение блокатора внутри канала не меняет свойств рецептора, такая схема может быть представлена следующим образом:



где все константы в нижнем ряду (со штрихом) равны соответствующим им константам в верхнем ряду (без штриха).  $RB$ ,  $ARB$  и  $A_2RB$  – состояния рецептора с блокатором, находящимся внутри закрытого канала,  $A_2R^oB$  – состояние рецептора с открытым заблокированным каналом. В этой модели можно воспроизвести четыре из пяти основных критериев, но данная модель не позволила воспроизвести установившийся уровень постоянных времени спада ТКП под действием мекамиламина в концентрации 20 мкмоль – в модели величины постоянных времени спада в этой ситуации оказались равны контрольным. Этот результат показывает, что «симметричная» ловушечная схема может применяться для объяснения действия вещества только если оно уменьшает амплитуду ТКП, не изменяя его постоянной времени спада.

Модель 3. В литературе имеются сведения о том, что нахождение блокатора внутри закрытого канала может изменить кинетику взаимодействия рецептора с агонистом и/или кинетику открытия-закрытия канала (Dilmore, Johnson, 1998). В этом случае можно применить ту же схему (7), но некоторые константы в нижнем ряду (со штрихом) могут быть не равны соответствующим им константам в верхнем ряду (без штриха). «Асимметричная» ловушечная схема при  $k_b^- = 3.2 \text{ мс}^{-1}$  ( $H = 27.5 \text{ мВ}$ ),  $k_b^+ = 300 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{мс}^{-1}$  воспроизводит все пять основных характеристик действия мекамиламина (Таб. 2). Хотя для этой схемы в установившемся режиме **средний** обмен между верхней и нижней частями (за время между двумя активациями рецепторов) также отсутствует, в силу неравенства кинетики этих частей “заполнение” состояний  $A_2R^0$  и  $A_2R^0B$  происходит несинхронно и возможны обменные потоки между этими состояниями (сумма этих потоков за одну активацию должна быть равна нулю). Требуемое замедление перехода из  $RB$  в  $A_2R^0B$  и ускорение обратного перехода произведено в модели за счет увеличения  $\alpha'$  по сравнению с  $\alpha$  от  $1.7 \text{ мс}^{-1}$  до  $4.5 \text{ мс}^{-1}$ .

Таблица 2. Сравнение экспериментальных и модельных характеристик действия мекамиламина в концентрации 20 мкмоль

	Установив- шаяся амплитуда ТКП	Установив- шаяся постоянная времени спада ТКП	Восстанов- ление амплитуд ТКП. Без стимуляции*	Восстанов- ление амплитуд ТКП. Стимуляция 3 раза в минуту*	Восстанов- ление амплитуд ТКП. Стимуляция 10 раз в секунду*
	% к контролю		% к амплитуде ТКП до деполяризации		
Эксперимент**	28±2	57±4	1±3	134±5	131±5
Модель 1	28	58	<b>149</b>	131	<b>-99</b>
Модель 2	28	<b>100</b>	0	131	131
Модель 3	29	57	0	132	131

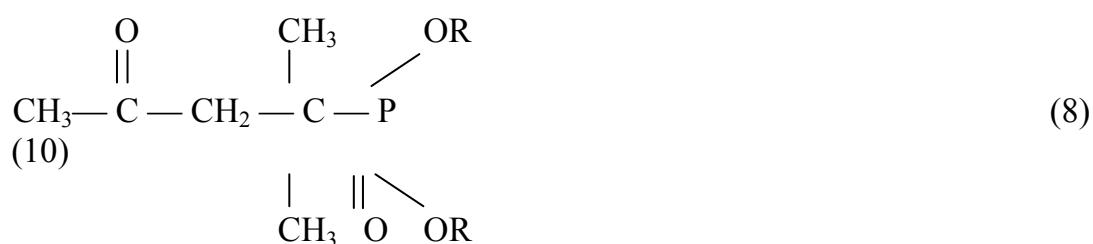
\* во всех трех случаях мембрану деполяризовали от -70 мВ до -20 мВ.

\*\* n = 8.

Аналогичные по протоколам экспериментальные исследования действия мекамиламина на параметры токов, вызываемых аппликациями никотина в хромаффинных клетках крыс (содержащих ионотропные холинорецепторы нейронального типа  $\alpha_3\beta_4$ ), дали качественно такие же результаты, отличия заключались лишь в величинах  $IC_{50}$  (0.34 мкмоль) и  $\delta$  (0.72). Кроме того, было исследовано действие мекамиламина на параметры токов, вызываемых аппликациями ацетилхолина в мышечных клетках крыс на фазе миотубулы (содержащих ионотропные холинорецепторы типа  $\alpha_1\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ ), где также были получены качественно аналогичные результаты, отличия заключались лишь в величине  $IC_{50}$  (8.1 мкмоль) и меньшей скорости возврата амплитуд токов к стационарному уровню после сочетания активации рецепторов с деполяризацией клеточной мембраны. Все характеристики действия мекамиламина в обоих указанных объектах воспроизводились «асимметричной» ловушечной схемой блокады открытых каналов.

#### Влияние производных 1,1-диметил-3-оксобутил-фосфоновой кислоты на функционирование никотиновых холинорецепторов мышечного типа.

Общая структура эфиров 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты следующая:



где R = H для самой кислоты, CH<sub>3</sub> для диметилового эфира (Димефосфона), C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

для диэтилового эфира,  $C_3H_7$  для дипропилового эфира,  $C_4H_9$  для дибутилового эфира. Определение коэффициентов распределения (K), рассчитанных как соотношение концентрации соединений в октанольной и водной фазе, показало, что  $K = 1.09 \pm 0.09$ ;  $8.64 \pm 0.34$ ;  $89.36 \pm 5.13$ ;  $>1000$  для диметилового, диэтилового, дипропилового и дибутилового эфиров соответственно.

В Таб. 3 приведены сводные данные о влиянии исследованных эфиров на амплитуду и время спада ТКП и мТКП в нервно-мышечном соединении лягушки. Все соединения вызывали концентрационнозависимое угнетение амплитуды и изменение времени спада ТКП и мТКП, что указывает на определенное сходство в механизме их действия. Однако на фоне применения диметилового эфира в концентрации 100 и 500 мкмоль наблюдалась двухфазность спада ТКП, чего не наблюдалось при использовании других эфиров. Эффекты диметилового эфира отмывались на  $66 \pm 4\%$  ( $n = 10$ ) в течение 20 минут, но с увеличением длины молекулы в гомологическом ряду отмывание эффектов затруднялось. Так, при обработке нервно-мышечного препарата дибутиловым эфиром отмывка за 30 минут составила  $45 \pm 5\%$  ( $n = 6$ ).

Таблица 3. Влияние производных 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты на основные характеристики ТКП и мТКП (достоверные эффекты выделены жирным шрифтом).

Соединения	Концентрация, мкмоль	Изменение амплитуды ТКП, %	Изменение постоянной времени спада ТКП, %	Изменение амплитуды мТКП, %	Изменение постоянной времени спада мТКП, %
Диметиловый эфир	10	<b><math>-7 \pm 5</math></b>	<b><math>-8 \pm 14 / +41 \pm 11</math></b>	$-2 \pm 6$	<b><math>-0 \pm 4 / +39 \pm 10</math></b>
	100	<b><math>-25 \pm 3</math></b>	<b><math>-27 \pm 15 / +90 \pm 20</math></b>	<b><math>-25 \pm 7</math></b>	<b><math>-12 \pm 9 / +83 \pm 14</math></b>
	500	<b><math>-32 \pm 5</math></b>	<b><math>-35 \pm 14 / +125 \pm 23</math></b>	<b><math>-40 \pm 7</math></b>	<b><math>-25 \pm 9 / +117 \pm 28</math></b>
Диэтиловый эфир	10	$0 \pm 7$	$0 \pm 6$	$0 \pm 8$	$0 \pm 7$
	100	<b><math>-23 \pm 6</math></b>	<b><math>-15 \pm 8</math></b>	<b><math>-9 \pm 5</math></b>	<b><math>-10 \pm 4</math></b>
	500	<b><math>-39 \pm 8</math></b>	<b><math>-20 \pm 9</math></b>	<b><math>-16 \pm 7</math></b>	<b><math>-16 \pm 9</math></b>
Дипропиловый эфир	10	<b><math>-10 \pm 7 \%</math></b>	$0 \pm 8 \%$	$-6 \pm 8 \%$	$0 \pm 9 \%$
	100	<b><math>-30 \pm 9 \%</math></b>	<b><math>-21 \pm 7 \%</math></b>	<b><math>-15 \pm 8 \%</math></b>	<b><math>-17 \pm 9 \%</math></b>
	500	<b><math>-47 \pm 10 \%</math></b>	<b><math>-34 \pm 11 \%</math></b>	<b><math>-30 \pm 9 \%</math></b>	<b><math>-26 \pm 12 \%</math></b>
Дибутиловый эфир	10	<b><math>-14 \pm 9 \%</math></b>	$-3 \pm 8 \%$	<b><math>-11 \pm 5 \%</math></b>	$0 \pm 7 \%$
	100	<b><math>-34 \pm 8 \%</math></b>	<b><math>-19 \pm 7 \%</math></b>	<b><math>-26 \pm 10 \%</math></b>	<b><math>-17 \pm 7 \%</math></b>
	500	<b><math>-56 \pm 13 \%</math></b>	<b><math>-39 \pm 9 \%</math></b>	<b><math>-51 \pm 9 \%</math></b>	<b><math>-30 \pm 11 \%</math></b>

\* Для диметилового эфира в колонке «Изменение постоянной времени спада» указано: изменение постоянной времени спада быстрой/медленной компоненты.

\*\* При фиксации мембранного потенциала на уровне  $-45$  мВ средняя амплитуда ТКП в контроле составила  $93.7 \pm 3$  нА ( $n = 6$ ), средняя амплитуда мТКП в контроле составила  $1.5 \pm 0.3$  нА ( $n = 8$ ).

В контроле постоянная времени спада токов экспоненциально зависела от мембранного потенциала, а на фоне диэтилового, дипропилового и дибутилового

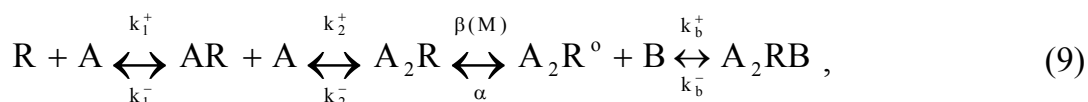
эфиров не зависела от изменений мембранного потенциала. Такие изменения в характере потенциалзависимости постоянной времени спада ТКП и неполная отмывка их эффектов не характерны для действия электрически нейтральных блокаторов открытого ионного канала медленного типа (Хазипов и др., 1990; Ogden et al., 1981). Подобные эффекты могут быть вызваны не прямым каналоблокирующим, а возможным аллостерическим действием веществ на холинорецепторы (изменяющим кинетику работы самих каналов) со стороны пограничного липидного слоя после частичного растворения эфиров в постсинаптической мембране. Именно действие через липидную мембрану может объяснить изменение характера блока ионного канала в гомологическом ряду производных 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты, т.к. с ростом длины углеводородного радикала и, соответственно, с увеличением липофильности соединений увеличивается производимый ими эффект.

Для различения механизмов действия исследуемых эфиров было проведено несколько дополнительных серий экспериментов, в которых сравнивались эффекты наименее липофильного диметилового и наиболее липофильного дибутилового эфиров. Прежде всего, было проверено влияние повышения частоты активации рецепторов на эффект указанных двух эфиров. В контроле при частоте стимуляции 60 имп/с в пачке из 20 сигналов наблюдалась потенция с повышением амплитуды 2-5 сигналов, затем переходившая в депрессию. В среднем амплитуда 20-го сигнала была на  $9 \pm 3\%$  меньше амплитуды первого сигнала ( $n = 4$ ). На фоне аппликации диметилового эфира в концентрации 100 мкмоль (после полного развития эффекта, то есть через 20-30 минут действия вещества) также наблюдалась первоначальная потенция с переходом в депрессию, амплитуда 20-го сигнала была в среднем на  $16 \pm 4\%$  меньше амплитуды первого ( $n = 5$ ). На фоне аппликации дибутилового эфира в концентрации 100 мкмоль амплитуда 20-го сигнала была в среднем на  $65 \pm 5\%$  меньше амплитуды первого ( $n = 4$ ).

Для выяснения вопроса о месте локализации эффектов исследовалось развитие эффектов диметилового и дибутилового эфиров в концентрации 100 мкмоль при редкой – один раз в две минуты – активации рецепторов, то есть практически в отсутствие открытых каналов. Эффект диметилового эфира при редкой активации рецепторов развивается существенно медленнее (Рис. 2А), в то время как эффект дибутилового эфира в этой ситуации развивается почти так же, как при обычной стимуляции три раза в минуту (Рис. 2Б). Данные о степени развития эффектов соединений при отключении стимуляции (и, следовательно, существенном уменьшении частоты открытия ионных каналов холинорецепторов) говорят о том, что часть эффектов соединений обуславливается их действием на синаптическую мембрану, а часть – напрямую через открытые ионные каналы, т.к. при включении стимуляции развитие эффектов значительно ускоряется в первые минуты.

Как показали проведенные исследования, действие эфиров 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты развивается в отсутствие открытых каналов, но в то же время их эффект зависит и от частоты активации каналов. Значит, механизм их действия должен быть, по крайней мере, двухкомпонентным, но при этом они не могут быть конкурентными блокаторами или блокаторами закрытого канала ввиду сильного влияния на постоянную времени спада мТКП и слабой отмывки (Akasu, Koketsu, 1986; Krampfl et al., 2000). Можно предположить, что первым компонентом механизма действия исследуемых эфиров является независимая от

наличия открытых каналов аллостерическая модуляция, а вторым – блокада открытого канала:



где В – эфир в функции блокатора открытого канала, М – тот же эфир, действующий как аллостерический модулятор.

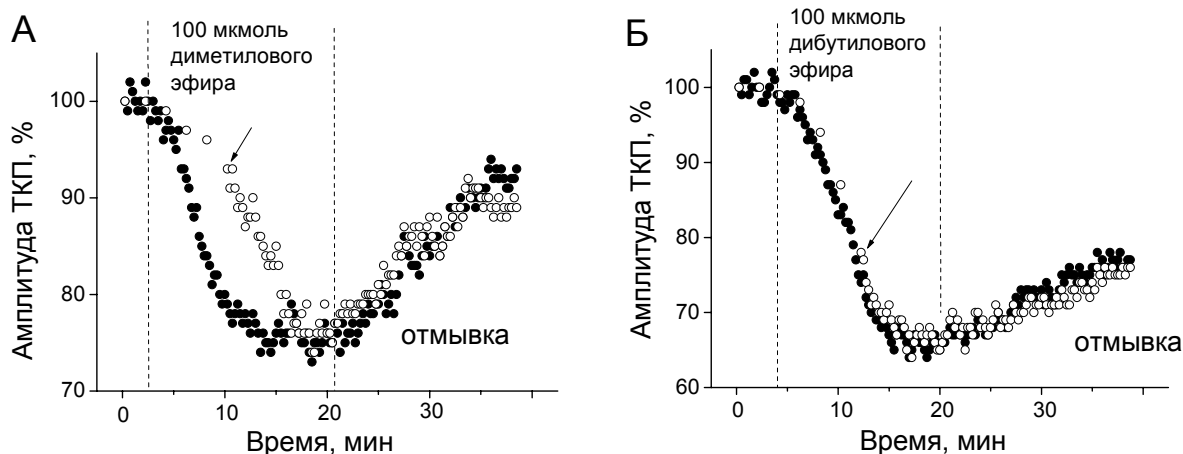


Рис. 2. Изменения амплитуды ТКП под действием диметилового (А) и дибутилового (Б) эфиров в концентрации 100 мкмоль. ● – непрерывная стимуляция три раза в минуту, ○ – от подачи вещества до стрелки стимуляция 1 раз в 2 минуты, далее непрерывная стимуляция три раза в минуту.

Для проверки этой гипотезы и выяснения конкретных значений констант скоростей реакций взаимодействия исследуемых эфиров с рецепторно-канальным комплексом было проведено математическое моделирование кинетики этого взаимодействия. Адекватность модели проверялась 1) воспроизведением в модели экспериментально полученного стационарного уровня изменения амплитуды и постоянной времени спада мТКП при трех концентрациях веществ; 2) воспроизведением в модели экспериментально полученного уровня изменения амплитуды ТКП при высокочастотной (60 имп/с) стимуляции нерва; 3) воспроизведением в модели экспериментально обнаруженного действия дибутилового эфира в отсутствие доступных открытых каналов. Все описанные экспериментальные эффекты были воспроизведены при наборе констант, приведенном в Таб. 4.

Поскольку в модели можно “отключить” по очереди каждый из двух механизмов, был оценен вклад каждого из них в общий эффект. Таб. 5 показывает опережающий рост модулирующих свойств веществ при увеличении длины их эфирных радикалов при активации каналов один раз в 15 секунд. Таким образом, при редкой активации каналов влияние дибутилового эфира определяется в основном его модулирующими свойствами, в то время как у диметилового преобладающими являются блокирующие свойства.

Таблица 4. Влияние производных 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты на основные характеристики мТКП в модели.

Соединения	Концентрация, мкмоль	Изменение амплитуды мТКП, %	Изменение постоянной времени спада мТКП, %	$\beta$ , мс <sup>-1</sup>	$k_b^+$ , мкмоль <sup>-1</sup> ·мс <sup>-1</sup>	$k_b^-$ , мс <sup>-1</sup>
Диметиловый эфир	10	-2	3	36.7	6	1.0
	100	-19	-33/145	29		
	500	-47	-74/169	26		
Диэтиловый эфир	10	-1	-1	36	0.9	0.2
	100	-10	-15	28		
	500	-21	-30	25		
Дипропиловый эфир	10	-1	-2	35	0.5	0.002
	100	-13	-19	24		
	500	-23	-33	20		
Дибутиловый эфир	10	-7	-10	29	0.3	0.001
	100	-28	-29	15		
	500	-43	-40	10		

Таблица 5. Вклады блокады и аллостерической модуляции в результирующий эффект эфиров на амплитуду модельных ТКП при низкой частоте активации (три раза в минуту).

Эфир		Вклад модуляции, %	Вклад блокады, %
500 мкмоль	Диметиловый	18	82
	Диэтиловый	48	52
	Дипропиловый	72	28
	Дибутиловый	93	7

#### **Влияние хлоргексидина на функционирование никотиновых холинорецепторов мышечного типа.**

Известный антисептик хлоргексидин в концентрации 5 мкмоль при редких раздражениях двигательного нерва (3 импульса в минуту) вызывал снижение амплитуды и постоянной времени спада ТКП до  $34.2 \pm 7.3\%$  и  $53.5 \pm 3.2\%$  ( $n = 10$ ) соответственно (Рис. 3). При удалении хлоргексидина после развития его эффекта из омывающего препарат раствора за 50 мин амплитуда ТКП «отмывалась» лишь до  $41.7 \pm 6.7\%$  от исходного значения, то есть достоверной отмывки не наблюдалось (Рис. 3). Столь медленная «отмывка» в сочетании с нетоксичностью хлоргексидина свидетельствуют о том, что основным механизмом действия этого вещества не могут быть ни конкурентная блокада, ни блокада открытого или закрытого канала. При этом сильное влияние хлоргексидина на постоянную времени спада ТКП также свидетельствует, что он не может быть конкурентным блокатором или блокатором закрытого канала (Akasu, Koketsu, 1986; Krampfl et al., 2000).

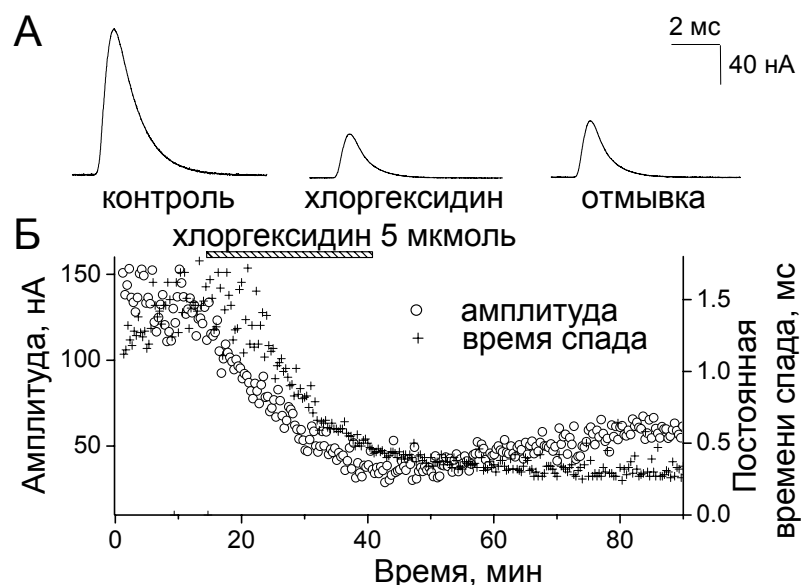


Рис. 3. Изменение амплитуды и постоянной времени спада ТКП под действием хлоргексидина в концентрации 5 мкмоль при мембранном потенциале -70 мВ. Частота раздражений нерва 3 импульса в минуту. А. ТКП в контроле, на фоне установившегося действия хлоргексидина и через 40 минут отмывки. Б. Изменение амплитуды и постоянной времени спада ТКП в течение эксперимента.

Снижение амплитуды и времени спада ТКП характерно для блокаторов медленного типа, ингибиторов ацетилхолинэстеразы и веществ, ускоряющих десенситизацию. С целью уточнения механизма действия хлоргексидина были проведены эксперименты при стимуляции нерва с частотами от 0.1 до 60 имп/с. В контроле амплитуда двадцатого сигнала в пачке по отношению к первому при частоте стимуляции 0.1 имп/с составляла  $94.2 \pm 3.3\%$ , при частоте 1 имп/с  $95.6 \pm 1.8\%$  (везде  $n = 4$ ). При дальнейшем повышении частоты в пачке наблюдалась потенциация: отношение амплитуды двадцатого сигнала к амплитуде первого при частоте 10 имп/с составило  $108.3 \pm 7.8\%$  а при частоте 60 имп/с  $119.6 \pm 13.1\%$  (везде  $n = 4$ ). При перфузии нервно-мышечного препарата раствором с концентрацией хлоргексидина 2 мкмоль во всех случаях в пачках наблюдалась явно выраженная депрессия, усиливающаяся по мере роста частоты стимуляции нерва: отношение амплитуды двадцатого сигнала к амплитуде первого составило  $86.7 \pm 4.5\%$ ,  $72.2 \pm 4.3\%$ ,  $57.1 \pm 2.8\%$ ,  $31.4 \pm 34.2\%$  при частоте стимуляции соответственно 0.1, 1, 10 и 60 имп/с (везде  $n = 4$ ).

Поскольку снижение амплитуды сигналов в пачке при ритмической стимуляции является типичным признаком действия, в частности, ингибиторов холинэстеразы, в следующей серии экспериментов мы проверяли возможное действие хлоргексидина на функционально активную синаптическую ацетилхолинэстеразу. Для этого была проведена серия экспериментов с использованием ингибитора ацетилхолинэстеразы – армина. В контрольных условиях армин в концентрации 5 мкмоль, достаточной для ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы, не вызывал увеличения амплитуды ТКП, но увеличивал постоянную времени спада на  $325.6 \pm 29.8\%$  ( $n = 4$ ). При использовании хлоргексидина в концентрации 2 мкмоль на фоне действия армина амплитуда двадцатого сигнала в пачке по отношению к первому при частоте стимуляции 0.1 имп/с равнялась  $82.3 \pm 9.1\%$ , при частоте 1 имп/с  $82.6 \pm 6.7\%$ , при частоте 10 имп/с



60±8.9 % (для всех экспериментов  $n = 4$ ). Этот результат не отличался достоверно от действия хлоргексидина на фоне активной холинэстеразы. Поскольку величина депрессии при ингибировании ацетилхолинэстеразы достоверно не менялась, хлоргексидин не является веществом, ускоряющим десенситизацию.

Важным показателем является также потенциалзависимость эффекта, которая позволяет пролить свет на механизм действия вещества. Проведенные исследования показали, что депрессия в пачках не зависит от приложенного потенциала. Так депрессия ритмической стимуляции в пачке при -70 мВ составила 57.1±2.8%, при -100 мВ 62.9±7.9%, при +30 мВ 62.7±5.9% (везде  $n = 4$ ).

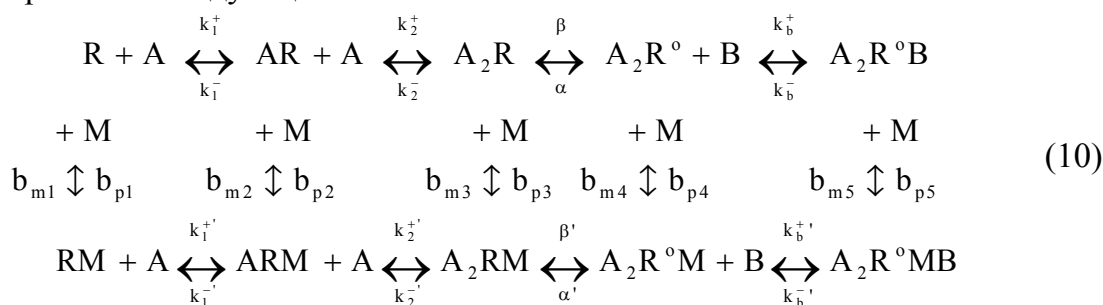
Характерный для блокаторов ловушечного типа феномен разблокирования при сочетании деполяризации клеточной мембраны с активацией рецепторов наблюдался и при действии хлоргексидина на никотиновые холинорецепторы мышечного типа. Эксперименты проводили после 30-40 минут действия вещества, то есть после выхода параметров ТКП на стационарный уровень. Сочетание деполяризации клеточной мембраны с продолжающимися раздражениями нерва вызывало частичное разблокирование каналов, хотя одна лишь деполяризация без раздражений нерва не приводила к эффекту разблокирования, указывая на принципиальное значение сочетания двух стимулов. Следовательно, в нормальной физиологической ситуации, когда каждое раздражение нерва вызывает деполяризацию постсинаптической мембраны и, как правило, возникновение на ней потенциала действия, описанный эффект будет значительно снижать эффективность ингибирующего действия хлоргексидина. Величина разблокирования, оцениваемая по увеличению первого сигнала после возврата к нормальному мембранному потенциалу по сравнению с последним сигналом перед деполяризацией при деполяризации от -70 мВ до -20 мВ и при концентрации хлоргексидина 5 мкмоль, была равна 124.4±13.6 % ( $n = 4$ ). Надо отметить, что в отличие от случая с аналогичным эффектом частичного разблокирования для блокатора ловушечного типа мекамиламина, для хлоргексидина эффект разблокирования сохранялся длительное время (около 5 мин) после возврата к нормальному потенциалу мембраны.

Были также проведены эксперименты, в которых хлоргексидин подавался на фоне предварительной активации рецепторов карбахолином, причем в этом случае эффект хлоргексидина развивался быстрее. Это говорит в пользу того, что хлоргексидин относится к блокаторам открытого канала. В действии хлоргексидина наблюдаются многие признаки, характерные для блокаторов открытого канала, но одним из основных свойств последних является быстрая отмывка, чего в случае с хлоргексидином не наблюдается. Медленная отмывка характерна для блокаторов открытого канала с ловушечным механизмом действия, но для них отмывка резко ускоряется экзогенным агонистом, чего также не наблюдается в случае хлоргексидина. Трудно предположить, что нетоксичное, широко применяемое лекарственное вещество может необратимо связываться с ионным каналом, поэтому была выдвинута гипотеза о том, что амфифильный хлоргексидин может оказывать аллостерическое воздействие на рецепторно-канальный комплекс, предварительно растворяясь в окружающей его липидной мембране, выход из которой назад в водную фазу в этом случае будет затруднен. То есть хлоргексидин обладает сложным механизмом действия, первым компонентом которого является аллостерическая модуляция рецепторно-канального комплекса растворенным в его липидном окружении веществом, а

вторым – блокада открытого канала.

Для косвенной проверки этой гипотезы были проведены эксперименты, в которых хлоргексидин в концентрации 10 мкмоль подавался на фоне установившихся параметров ТКП на время, которое необходимо для того, чтобы развился его эффект, однако при этом стимуляция нерва отключалась. Если бы хлоргексидин является блокаторм открытого канала, то никакого значительного снижения параметров в этом случае не было бы, так как не было активации рецепторов, а следовательно – и каналов в открытом состоянии. Однако в результате экспериментов было получено снижение амплитуды до  $54.4 \pm 1.5\%$ , а времени спада до  $62.2 \pm 10.4\%$ , причем после включения стимуляции параметры снижались до тех же значений, что и в экспериментах без отключения стимуляции. Для сравнения, при непрерывной стимуляции хлоргексидин в этой же концентрации снижал эти параметры до  $34 \pm 7\%$  и  $53 \pm 2.9\%$ , то есть в отсутствие стимуляции эффект хлоргексидина развивался на 70-80% от его значения при стимуляции нерва.

Таким образом, влияние хлоргексидина на амплитудно-временные характеристики может быть интерпретировано с использованием схемы, сочетающей механизм блокирования открытого ионного канала с механизмом аллостерической модуляции:



где В – хлоргексидин в функции блокатора открытого канала, М – хлоргексидин, действующий как аллостерический модулятор. При подборе значений кинетических констант для оценки адекватности модели экспериментальным данным были использованы следующие критерии: 1) зависимость изменения амплитуды и постоянной времени спада от концентрации вещества; 2) 70%-е снижение амплитуды хлоргексидином в отсутствие открытых каналов; 3) кинетика изменения амплитуды во время частотной стимуляции. Математическое моделирование на основе схемы (10) показало, что все описанные экспериментальные эффекты воспроизводятся при наборе констант, приведенном в Таблице 6.

Таблица 6. Значения констант скоростей реакций, использованные для моделирования кинетики ионотропных холинорецепторов мышечного типа.

$k_1^+$ , 1/ммоль·мс	160	$k_1'^+$ , 1/ммоль·мс	130
$k_1^-$ , 1/мс	18	$k_1'^-$ , 1/мс	20
$k_2^+$ , 1/ммоль·мс	80	$k_2'^+$ , л/ммоль·мс	65
$k_2^-$ , 1/мс	36	$k_2'^-$ , 1/мс	40
$\beta$ , 1/мс	36.7	$\beta'$ , 1/мс	12
$\alpha$ , 1/мс	1.7 (H = 156 мВ)	$\alpha'$ , 1/мс	3.4 (H = 156 мВ)
$k_b$ , 1/ммоль·мс	0.08	$k_b'$ , 1/ммоль·мс	0.09

$m_b$ , 1/мс	0.03	$m_b'$ , 1/мс	0.03
$b_{m1}$ , 1/мс	0.00002	$b_{p1}$ , 1/ммоль·мс	0.0000083
$b_{m4}$ , 1/мс	0.00002	$b_{p4}$ , 1/ммоль·мс	0.0000083
$b_{m5}$ , 1/мс	0.00002	$b_{p5}$ , 1/ммоль·мс	0.0000083

Для потенциалзависимых констант приведены значения при -70 мВ.

### **Исследование механизма влияния рН на функционирование P2X<sub>2</sub>.**

На Рис. 4А и Б приведены записанные в одной клетке типичные ответы клеток PC12 на двухсекундные аппликации АТФ в двух концентрациях при двух уровнях рН. Видно, что при низкой концентрации АТФ (10 мкмоль) переход от рН 7.4 к рН 6.0 вызывает существенное увеличение возникающего тока (Рис. 4Аа и Ба). Совсем иная ситуация наблюдается при высокой концентрации АТФ (1 ммоль). При нормальной кислотности среды (рН = 7.4) ток, вызываемый высокой концентрацией АТФ, медленно спадает, переход от рН 7.4 к рН 6.0 при высокой концентрации АТФ не только вызывает уменьшение амплитуды тока (на  $23 \pm 3\%$ ,  $n = 6$ ), но и существенно меняет его форму (Рис. 4Аб и Бб). Возникает очевидный спад тока (постоянная времени спада  $740 \pm 50$  мс,  $n = 9$ ), причем ток спадает до уровня, составляющего  $54 \pm 2\%$  ( $n = 9$ ) от амплитудного значения. Кроме того, в момент прекращения аппликации АТФ возникает кратковременное восстановление тока ( $I_2$  на Рис. 4Бб), величина которого составляет  $88 \pm 7\%$  ( $n = 9$ ) от амплитуды тока. Важно отметить необходимость высокой концентрации и АТФ и ионов водорода для возникновения этого феномена; при низкой концентрации АТФ никакое закисление среды не может вызвать восстановление тока, и, соответственно, при низкой концентрации ионов водорода никакая концентрация АТФ также не способна сделать это.

На Рис. 4В приведена зависимость амплитуд токов от концентрации апплицируемого АТФ при двух значениях рН (за 100 % принята амплитуда тока, вызываемого аппликацией АТФ в концентрации 1 ммоль при рН = 7.4). Результаты говорят о том, что кроме повышения сродства рецепторов к АТФ закисление также инициирует какой-то процесс инактивации, гораздо менее чувствительный к АТФ, чем процесс открытия каналов. Таким процессом инактивации могла бы быть блокада открытых каналов ионами водорода (Stoop, Quayle, 1998); в этом случае процесс инактивации должен быть сильно потенциалзависимым. Однако изменение рН от 7.4 до 6.0 не меняет потенциалзависимость амплитуд токов (Рис. 4Г). Кроме того, специально проведенные эксперименты показали, что изменения мембранного потенциала в диапазоне от -100 до +30 мВ не изменяют ни уровень, до которого спадает ток при действии АТФ, ни постоянную времени этого спада, ни величину восстановления тока, что противоречит гипотезе о блокаде открытых каналов положительно заряженными ионами водорода.

При моделировании в качестве основных критериев соответствия модели были приняты форма токов, увеличение амплитуд токов, вызываемых аппликацией АТФ в концентрации 10 мкмоль, при закислении среды и уменьшение амплитуд токов, вызываемых аппликацией АТФ в концентрации 1 ммоль, при закислении среды (сопровожаемое в последнем случае появлением кратковременного восстановления тока по окончании аппликации).

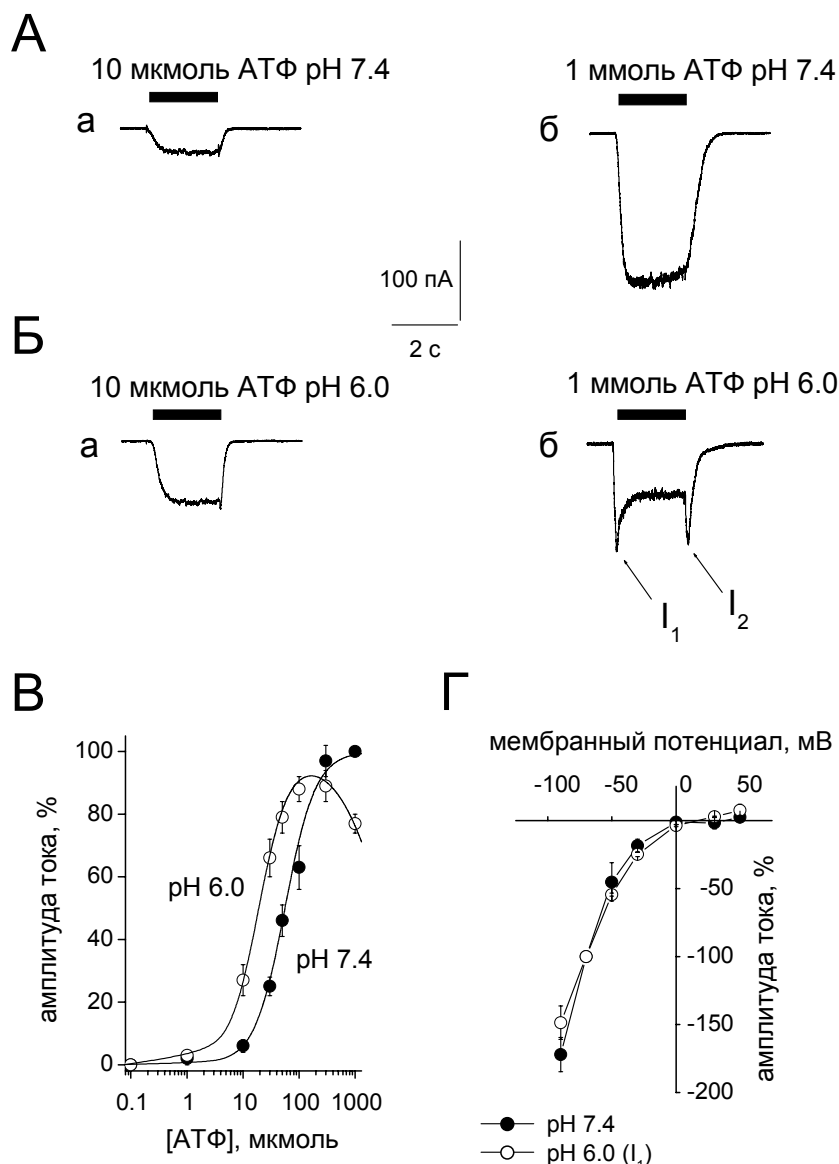
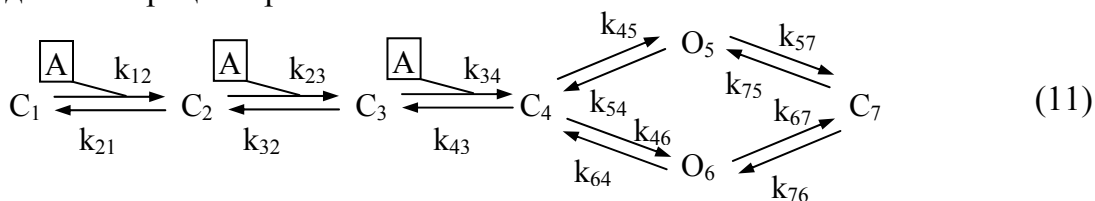


Рис. 4. Модуляция вызываемых двухсекундной аппликацией АТФ токов изменением рН внеклеточной среды. А. Типичные токи, возникающие при рН = 7.4 в ответ на аппликацию АТФ в концентрации 10 мкмоль (а) и 1 ммоль (б). Б. Типичные токи, возникающие при рН = 6.0 в ответ на аппликацию АТФ в концентрации 10 мкмоль (а) и 1 ммоль (б). Токи на А и Б записаны в одной клетке. В. Зависимости амплитуд токов от концентрации апплицируемого АТФ при рН = 7.4 и 6.0. Г. Зависимости амплитуд токов, вызываемых аппликацией АТФ в концентрации 1 ммоль при рН = 7.4 и 6.0, от мембранного потенциала. Для обеих зависимостей амплитуда тока при -70 мВ принималась за 100%. Для В и Г  $n = 6$ .

В исследовании, проведенном Дингом и Саксом (Ding, Sachs, 1999) на  $P2X_2$ , экспрессированных в клетки НЕК, была предложена следующая схема кинетики взаимодействия рецепторов с АТФ:



где С – P2X<sub>2</sub> с закрытым ионным каналом, О – P2X<sub>2</sub> с открытым каналом, А – АТФ, возле переходов указаны соответствующие им константы скоростей реакций. Однако полученные с помощью этой модели токи растут и спадают гораздо быстрее экспериментальных, не имеют спада во время действия АТФ и никак не зависят от кислотности среды.

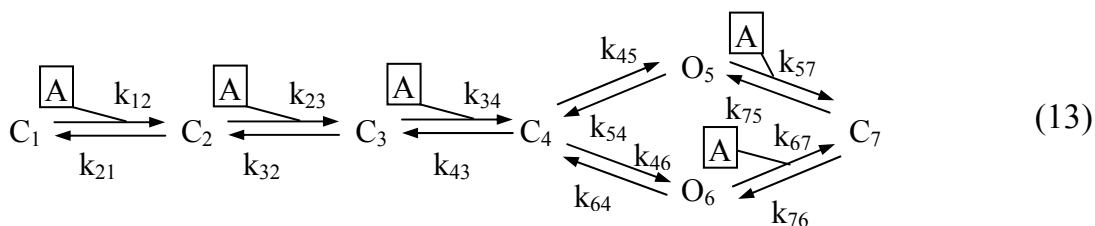
В работе (Liu et al., 1996) для случая присоединения к белку двух ионов водорода предложена следующая формула, описывающая зависимость константы скорости реакции от концентрации ионов водорода:

$$k_n = \frac{\alpha \cdot [H^+]^2 + \beta \cdot [H^+] + \gamma}{\delta \cdot [H^+]^2 + \varepsilon \cdot [H^+] + 1}, \quad (12)$$

где [H<sup>+</sup>] – концентрация ионов водорода, α, β, γ, δ, ε – эмпирические константы. Потенциация при закислении среды токов, вызываемых АТФ в концентрации 10 мкмоль, позволяет предположить, что величины констант k<sub>12</sub>, k<sub>23</sub> и k<sub>34</sub> растут при росте концентрации ионов водорода. Спад при закислении среды токов во время аппликации АТФ в концентрации 10 мкмоль позволяет предположить, что величины констант k<sub>57</sub> и k<sub>67</sub> также растут при росте концентрации ионов водорода.

В случае зависимости констант k<sub>57</sub> и k<sub>67</sub> от концентрации ионов водорода в кислой среде токи действительно имеют спад во время действия АТФ и кратковременное восстановление по окончании его действия. Однако восстановление тока в данной модели исчезает, если оставить неизменной кислотность среды после окончания действия АТФ. Экспериментальная проверка показала, что в действительности сохранение кислой среды по окончании действия АТФ не вызывает исчезновения феномена кратковременного восстановления тока, хотя и несколько ослабляет его. Если при отмывке физиологическим раствором с рН = 7.4 величина восстановления тока (в % к величине тока в конце аппликации АТФ) составляла 87±18 %, то при отмывке физиологическим раствором с рН = 6.0 она составляла 54±9 % (везде n = 5).

Поскольку экспериментальные результаты показали, что возникновение восстановления тока требует как кислой среды, так и высокой концентрации АТФ, естественно было предположить, что шаг инактивации рецепторов с открытым каналом является не только рН-зависимым, но и агонистзависимым. Это предположение приводит к следующей кинетической схеме:



Данная модель при предложенном Дингом и Саксом наборе констант качественно воспроизводит экспериментальные данные, хотя форма тока и не соответствует эксперименту. В связи с этим был найден новый, оптимизированный набор констант (Таблицы 7 и 8), при использовании которого модель (13) хорошо воспроизводит также и форму токов. Разумеется, по кинетической схеме невозможно определить конкретный механизм инактивации открытых каналов агонистом. Можно лишь утверждать, что это не простая блокада открытого канала, так как этот процесс является потенциалнезависимым и к тому же отрицательно заряженный АТФ вряд ли может войти в катионный канал.

Таблица 7. Коэффициенты, использованные в модели (13).

Константа	$k_{21}$	$k_{32}$	$k_{43}$	$k_{45}$	$k_{54}$	$k_{46}$	$k_{64}$	$k_{75}$	$k_{76}$
Величина	20	40	60	20	40	5	14	0.005	8.2

Величины констант выражены в  $\text{с}^{-1}$ .

Таблица 8. Коэффициенты, использованные в формуле (12) для воспроизведения зависимости констант  $k_{12}$ ,  $k_{23}$ ,  $k_{34}$ ,  $k_{57}$  и  $k_{67}$  от кислотности среды.

Константа	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\varepsilon$
$k_{12}$	28437.5	3250	1497	7.5	2.575
$k_{23}$	16562.5	2500	876	7.5	2.575
$k_{34}$	237500	12500	260	62.5	20
$k_{57}$	0.00625	0.1	0.043	0.0625	1.5
$k_{67}$	79.375	25.5	3	0.00313	0.5

Величины констант выражены в  $\text{ммоль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  для концентрации ионов водорода в  $\text{ммоль}$ .

Моделирование позволяет показать различную роль двух открытых состояний в потенциации токов и в возникновении восстановления тока. При  $\text{pH} = 7.4$  оба открытых состояния концентрационно-независимо участвуют в создании тока, хотя вклад состояния  $O_5$  несколько больше. При  $\text{pH} = 6.0$  при высокой концентрации АТФ вначале ток течет преимущественно через  $O_5$ , а восстановление тока по окончании действия агониста обеспечивается преимущественно состоянием  $O_6$ . То есть в последнем случае наблюдается как бы движение «по кольцу»:  $C_4 - O_5 - C_7 - O_6 - C_4$ . Это и позволяет получить на модели примерно одинаковую кинетику начального роста и спада тока и его позднейшего восстановления – при одном открытом состоянии кинетика восстановления и финального спада получается в модели при любых константах существенно медленнее, чем кинетика первоначального роста и спада тока.

### Исследование процесса десенситизации $\text{P2X}_3$

На Рис. 5А показаны типичные токи, вызываемые в сенсорных нейронах крыс двухсекундными аппликациями четырех агонистов  $\text{P2X}_3$ : 2-meSATФ, АТФ,  $\alpha, \beta$ -meATФ и  $\beta, \gamma$ -meATФ (все агонисты в концентрации 1  $\text{ммоль}$ ). Для всех агонистов токи в ходе аппликации спадают к нулю, что свидетельствует о быстрой и полной десенситизации. На Рис. 5Б показаны зависимости доза-эффект для всех четырех агонистов. По эффективности действия агонисты распределились следующим образом: 2-meSATФ ( $\text{EC}_{50} = 0.29 \pm 0.1 \text{ мкмоль}$ ) > АТФ ( $\text{EC}_{50} = 1.5 \pm 0.1 \text{ мкмоль}$ )  $\geq$   $\alpha, \beta$ -meATФ ( $\text{EC}_{50} = 1.8 \pm 0.2 \text{ мкмоль}$ ) >  $\beta, \gamma$ -meATФ ( $\text{EC}_{50} = 18 \pm 2.6 \text{ мкмоль}$ ). Постоянные времени спада токов, показывающие скорость перехода рецепторов в десенситизированное состояние, при концентрации агонистов 10  $\text{ммоль}$  были одинаковы для 2-meSATФ, АТФ и  $\alpha, \beta$ -meATФ ( $0.06 \pm 0.01 \text{ с}$ ,  $0.06 \pm 0.01 \text{ с}$  и  $0.06 \pm 0.02 \text{ с}$  соответственно), но втрое больше для  $\beta, \gamma$ -meATФ. При понижении концентрации постоянные времени спада токов росли для всех агонистов, хотя и в

разной степени (Рис. 5В).

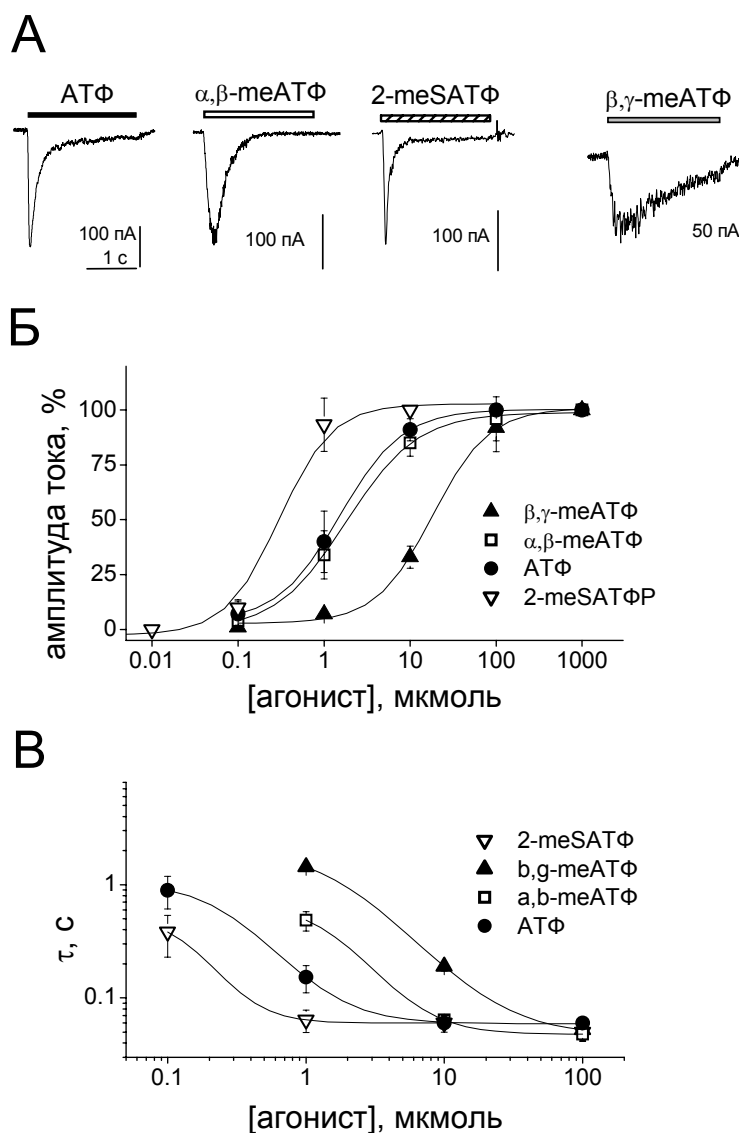


Рис. 5. Действие четырех агонистов на P2X<sub>3</sub> сенсорных нейронов. А. Образцы токовых ответов на двухсекундные аппликации АТФ, α,β-meАТФ, 2-meSATФ и β,γ-meАТФ (все в концентрации 10 мкмоль, записи сделаны в одном нейроне). Б. Зависимость амплитуд токовых ответов (в % от максимальной для каждого агониста) от концентрации апплицируемого на 2 с агониста (n = 5÷10). В. Зависимость постоянной времени спада токов τ от концентрации апплицируемого на 2 с агониста (n = 5÷12).

Скорость процесса восстановления P2X<sub>3</sub> после десенситизации оказалась зависящей от того, какой именно агонист вызвал десенситизацию (Рис. 6А), хотя сама десенситизация во всех случаях была полной. Наиболее быстрым было восстановление после действия β,γ-meАТФ (время восстановления амплитуды тока до 50% от контроля 0.32±0.03 минуты, n = 5), наиболее медленным – после действия 2-meSATФ (время восстановления амплитуды тока до 50% от контроля 3.22±0.07 минуты, n = 7). Обращает на себя внимание явная сигмоидность процесса восстановления P2X<sub>3</sub> после десенситизации, тогда как согласно классическим представлениям этот процесс является экспоненциальным (Katz, Thesleff, 1957).

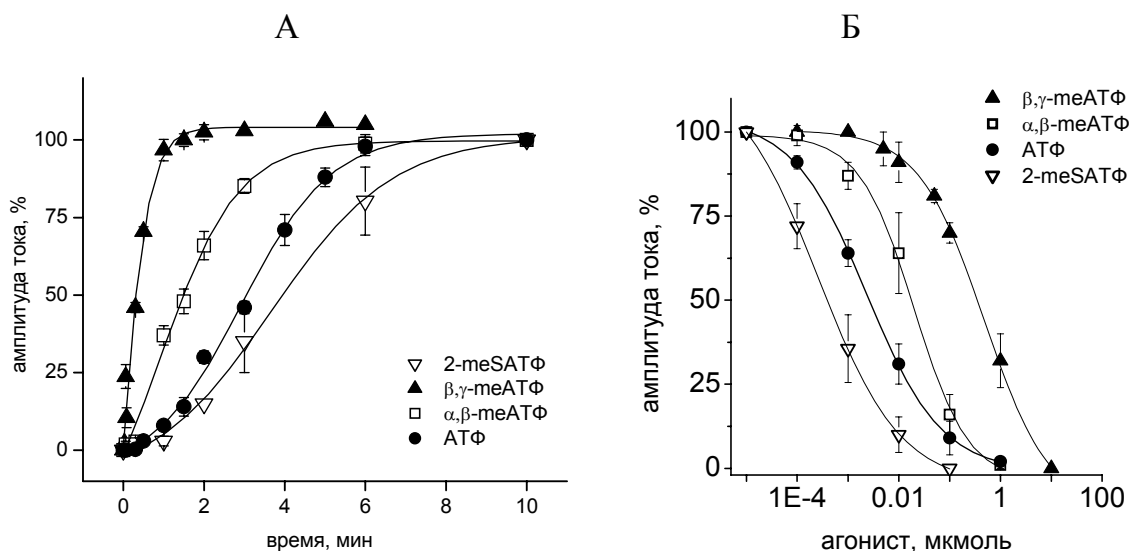


Рис. 6. А. Восстановление  $P2X_3$  после десенситизации, вызванной действием различных агонистов. На графике представлена зависимость амплитуды тока, вызванного второй 2-секундной аппликацией агониста, от времени, прошедшего с момента первой аппликации (в % от амплитуды тока, вызванного первой аппликацией). Агонисты применялись в эквивалентных концентрациях: 1 мкмоль для 2-meSATФ, 10 мкмоль для АТФ и  $\alpha,\beta$ -meATФ, 100 мкмоль для  $\beta,\gamma$ -meATФ ( $n = 4\div 10$ ). Б. Зависимость десенситизации, вызываемой 90-секундной аппликацией агониста, от его концентрации ( $n = 4\div 7$ ).

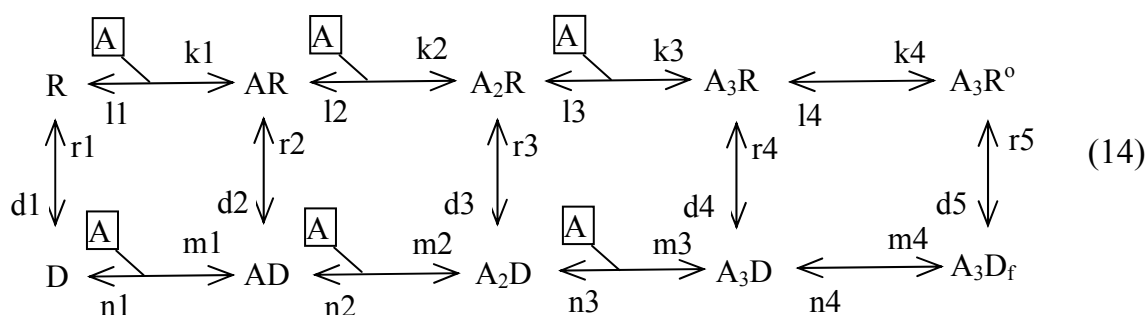
Феномен, называемый высокоаффинной десенситизацией, впервые был описан для холинорецепторов мышечного типа (Katz, Thesleff, 1957) и позднее показан для других типов холинорецепторов (см. Giniatullin et al., 2005). Суть этого феномена заключается в том, что длительная аппликация агониста в сверхнизкой, не вызывающей возникновения тока, концентрации приводит к уменьшению токового ответа на последующие аппликации агониста в нормальной концентрации. Для исследования данного феномена на  $P2X_3$  был использован следующий протокол: вначале подавалась 2-секундная аппликация АТФ в концентрации 10 мкмоль, через 6 минут отмывки на 90 с подавался исследуемый агонист в наномолярной концентрации и сразу по его окончании – вторая 2-секундная аппликация АТФ в концентрации 10 мкмоль. На Рис. 6Б показана для всех четырех агонистов зависимость десенситизации, вызываемой 90-секундной аппликацией агониста, от его концентрации. Из рисунка видно, что максимальной способностью к стимуляции высокоаффинной десенситизации обладает 2-meSATФ ( $IC_{50} = 0.43$  нмоль), далее идут АТФ ( $IC_{50} = 2.7$  нмоль),  $\alpha,\beta$ -meATФ ( $IC_{50} = 17$  нмоль) и  $\beta,\gamma$ -meATФ ( $IC_{50} = 310$  нмоль).

Таким образом, способность агониста к высокоаффинной десенситизации прямо коррелирует с эффективностью действия агонистов (см. Рис. 5Б) и обратно коррелирует со скоростью восстановления рецепторов после вызванной этими агонистами классической десенситизации (см. Рис. 6). Это означает, что процессы активации, восстановления и высокоаффинной десенситизации  $P2X_3$  не являются независимыми.

Поскольку до сих пор модели кинетики  $P2X_3$  не были описаны в литературе, вначале было необходимо выбрать модель, которая смогла бы адекватно описать быструю активацию  $P2X_3$ , их быстрый и полный переход в десенситизированное



состояние и последующее медленное сигмоидальное восстановление. На сегодня известны три принципиальные схемы: последовательная (использованная, например, для описания P2X<sub>1</sub>; Rettinger, Schmalzing, 2003); бифуркационная (использованная для описания рецепторов ГАМК; Jones, Westbrook, 1996); циклическая (предложенная исходно для холинорецепторов; Katz, Thesleff, 1957). Для проверки принципиальной возможности каждой из схем воспроизвести экспериментальные данные были использованы два главных критерия: быстрая полная десенситизация при действии агониста и медленное сигмоидальное восстановление. Проведенное исследование показало, что ни последовательная, ни бифуркационная схемы не способны воспроизвести одновременно быструю полную десенситизацию рецепторов при действии агониста и медленное сигмоидальное восстановление. В итоге, с учетом возможности перехода рецепторов в десенситизированное состояние минуя открытое, была применена следующая схема кинетики переходов:



Далее было необходимо найти значения констант скоростей реакций, при которых модель могла бы воспроизвести для всех агонистов: 1) зависимости доза-эффект; 2) зависимости постоянных времени спада токов от концентрации агониста; 3) зависимости восстановления после десенситизации от времени; 4) эффект высокоаффинной десенситизации (включая эффекты ранней и поздней подачи агониста). В Таб. 9 приведены наборы значений констант скоростей реакций для всех агонистов, которые позволили получить в модели наилучшее воспроизведение всех перечисленных экспериментальных эффектов. На Рис. 7 показано воспроизведение экспериментальных данных моделью кинетики P2X<sub>3</sub> с применением приведенного в Таб. 9 набора кинетических констант. Хорошее соответствие модельных данных экспериментальным свидетельствует о том, что данная модель адекватно описывает кинетику взаимодействия P2X<sub>3</sub> с агонистами и их десенситизацию.

Таблица 9. Значения констант скоростей реакций, использованные для моделирования кинетики P2X<sub>3</sub>.

константа	АТФ	α,β-meАТФ	β,γ-meАТФ	2-meSATФ
k1	120000	36000	30000	1200000
l1	20	8	110	50
k2	80000	24000	20000	800000
l2	40	16	220	100
k3	40000	12000	10000	400000
l3	60	24	330	150
k4	70	65	65	70

l4	1	1	1	1
m1	24000	3000	300	24000
n1	0.0085	0.019	0.1	0.007
m2	16000	2000	200	16000
n2	0.017	0.038	0.2	0.014
m3	8000	1000	100	8000
n3	0.0255	0.057	0.3	0.021
m4	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
n4	1	1	1	1
d1	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
r1	2.5	2.5	2.5	2.5
d2	0.2	0.12	1	0.6
r2	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
d3	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
r3	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
d4	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
r4	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
d5	23	20	20	23
r5	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001

Величины констант выражены в ммоль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> (k1, k2, k3, m1, m2, m3) или в с<sup>-1</sup>.

Из кинетической схемы понятно, что прежде чем перейти из состояния A<sub>3</sub>D<sup>0</sup> в состояние R рецепторы должны пройти ряд промежуточных состояний (A<sub>3</sub>D, A<sub>2</sub>D, AD, D), которые играют роль своеобразного функционального буфера. И именно временное накопление рецепторов в этих состояниях притормаживает восстановление на начальном этапе и делает его сигмоидальным. Выраженность этой сигмоидальности зависит от скорости прохождения рецепторов через промежуточные состояния.

### **Модельный анализ экспериментально проверяемых критериев различения механизмов ингибирования трансмембранных токов.**

Существует множество веществ, способных ингибировать постсинаптические токи. В данной работе рассмотрены только те из них, которые имеют чисто постсинаптическое действие, то есть не изменяют выброса агониста из пресинаптического нервного окончания. Однако сам факт ингибирования тока недостаточен для понимания механизма действия вещества, нужно определить какие-то дополнительные особенности его действия по специфическому влиянию на характеристики постсинаптического тока. Основные характеристики постсинаптического тока – его амплитуда, постоянная времени спада заднего фронта ( $\tau$ ) и время роста переднего фронта от 10% до 90% максимума. Была сделана попытка с помощью математического моделирования кинетики взаимодействия веществ с рецепторно-канальными комплексами выделить набор критериев, позволяющий однозначно классифицировать механизм действия ингибирующих постсинаптические токи веществ. Пока не были рассмотрены довольно редкие блокаторы закрытого канала, остальные же вещества классифицируются в следующие три группы.

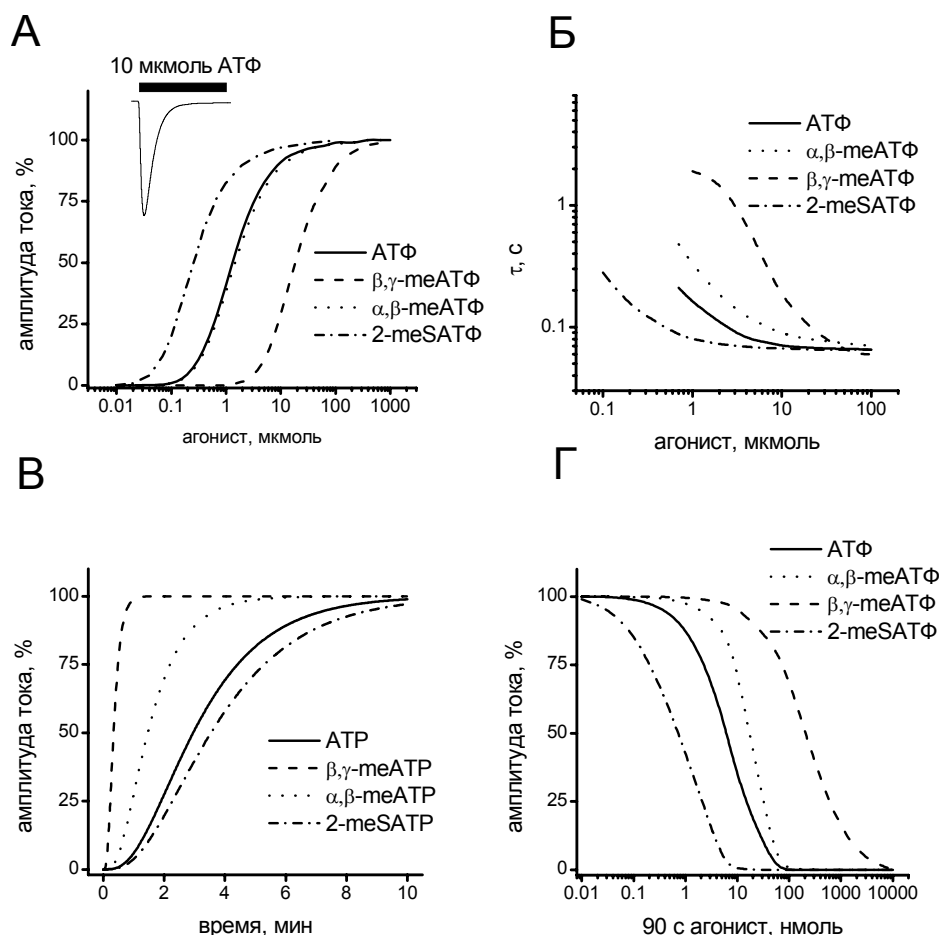


Рис. 7. Воспроизведение экспериментальных данных моделью кинетики P2X<sub>3</sub>. А. Модельные зависимости доза-эффект (на вставке показан пример модельного тока). Б. Модельные зависимости постоянных времени спада вызванных 2-секундной аппликацией агониста токов от концентрации агониста. В. Модельное восстановление P2X<sub>3</sub> после десенситизации 2-секундными аппликациями разных агонистов (агонисты применялись в эквиеффективных концентрациях: 1 мкмоль для 2-meSATФ, 10 мкмоль для АТФ и α,β-meATФ, 100 мкмоль для β,g-meATФ). Г. Модельная зависимость десенситизации, вызываемой 90-секундной аппликацией агониста, от его концентрации.

**Блокаторы.** Это вещества, так или иначе препятствующие открытию ионного канала. В свою очередь могут быть разделены на три подгруппы.

**Конкурентные блокаторы.** Вещества, способные связываться с посадочными сайтами агониста и препятствовать тем самым его посадке и последующему открытию канала.

**Блокаторы открытого канала.** Вещества, способные входить в открытый канал и «затыкать» его. Различают «быстрые», «медленные» и «средние» блокаторы открытого канала. У «медленных» скорость перехода из заблокированного в открытое состояние гораздо ниже скорости перехода из открытого в закрытое состояние, у «быстрых» – выше, у «средних» – примерно такая же.

**Блокаторы открытого канала ловушечного типа.** Вещества, способные не только входить в открытый канал и «затыкать» его, но и оставаться в канале при его закрытии. Различают «ловушечные» блокаторы не влияющие на кинетику работы рецептора при нахождении внутри закрытого канала и меняющие ее; среди

последних можно выделить ускоряющие закрытие канала и замедляющие его.

Аллостерические модуляторы. Это вещества, способные взаимодействовать с рецептором и менять его способность взаимодействовать с агонистом и открывать канал. Можно различить аллостерические модуляторы ускоряющие закрытие канала и замедляющие его. В последнем случае для ингибирования тока модулятор должен также понижать чувствительность рецептора к агонисту.

Ускорители десенситизации. Это вещества, способные взаимодействовать с рецептором и повышать его способность переходить в десенситизированное состояние, в котором канал не может открыться вне зависимости от присоединения агониста. Механизм действия этих веществ неясен, предполагается, что вещество-модулятор ускоряет все имеющиеся в кинетической схеме переходы рецептора в десенситизированное состояние

Проведенное математическое моделирование позволило показать, что все перечисленные механизмы имеют свои характерные особенности в отношении влияния на основные характеристики постсинаптических токов. Приведенный на Рис. 8 алгоритм позволяет однозначно классифицировать ингибирующее постсинаптический ток вещество по механизму его действия (невозможно различить лишь блокаторы открытых каналов медленного типа и ускорители десенситизации). Следует отметить, что данный алгоритм не противоречит известным способам различения ингибиторов – например, различению конкурентных и неконкурентных блокаторов по характерным сдвигам зависимости доза-эффект (Stephenson, 1956; Colquhoun, 1987, 1998). Однако этот способ позволяет отличить только один тип блокаторов – конкурентные; кроме того, зависимость доза-эффект может быть получена только при работе с изолированной клеткой, когда есть возможность менять концентрацию действующего на рецепторы агониста, но невозможно получить эту зависимость при исследовании синаптической передачи.

Первый шаг применения алгоритма – проверка влияния исследуемого ингибитора на постоянную времени спада постсинаптических токов. Если спад становится двухфазным, то исследуемое вещество является блокатором открытого канала среднего типа. Если в ходе развития эффекта спад токов временно ускоряется, а затем происходит возвращение к обычной скорости спада, то исследуемое вещество является блокатором ловушечного типа, не меняющим кинетику работы рецептора при нахождении внутри канала. Если постоянная времени спада токов увеличивается, то следует проверить, от чего зависит развитие и отмывка эффекта вещества – от времени его воздействия/отмывки (независимо от активации каналов) или от количества активаций каналов (независимо от времени между активациями). Если и развитие и отмывка эффекта зависят только от количества активаций каналов, то исследуемое вещество является блокатором ловушечного типа, замедляющим закрытие канала. Если и развитие и отмывка эффекта зависят только от времени, то исследуемое вещество является аллостерическим модулятором, замедляющим закрытие канала. Если развитие эффекта зависит от количества активаций каналов, а отмывка эффекта зависит от времени, то исследуемое вещество является блокатором открытого канала быстрого типа.

Если постоянная времени спада токов уменьшается, то следует проверить изменение эффекта при повышении частоты активации каналов. Если эффект усилится, то исследуемое вещество является блокатором открытого канала

медленного типа или ускорителем десенситизации. Если эффект не изменится, то следует проверить, от чего зависит развитие и отмывка эффекта вещества – от времени его воздействия/отмывки или от количества активаций каналов. Если и развитие и отмывка эффекта зависят только от количества активаций каналов, то исследуемое вещество является блокатором ловушечного типа, ускоряющим закрытие канала. Если и развитие и отмывка эффекта зависят только от времени, то можно проверить изменение эффекта при ингибировании разрушающего агонист в синаптической щели фермента – если эффект ослабевает, то исследуемое вещество является аллостерическим модулятором, ускоряющим закрытие канала, если эффект усиливается, то исследуемое вещество является конкурентным блокатором (в случае конкурентного блокатора укорочение спада токов является незначительным).

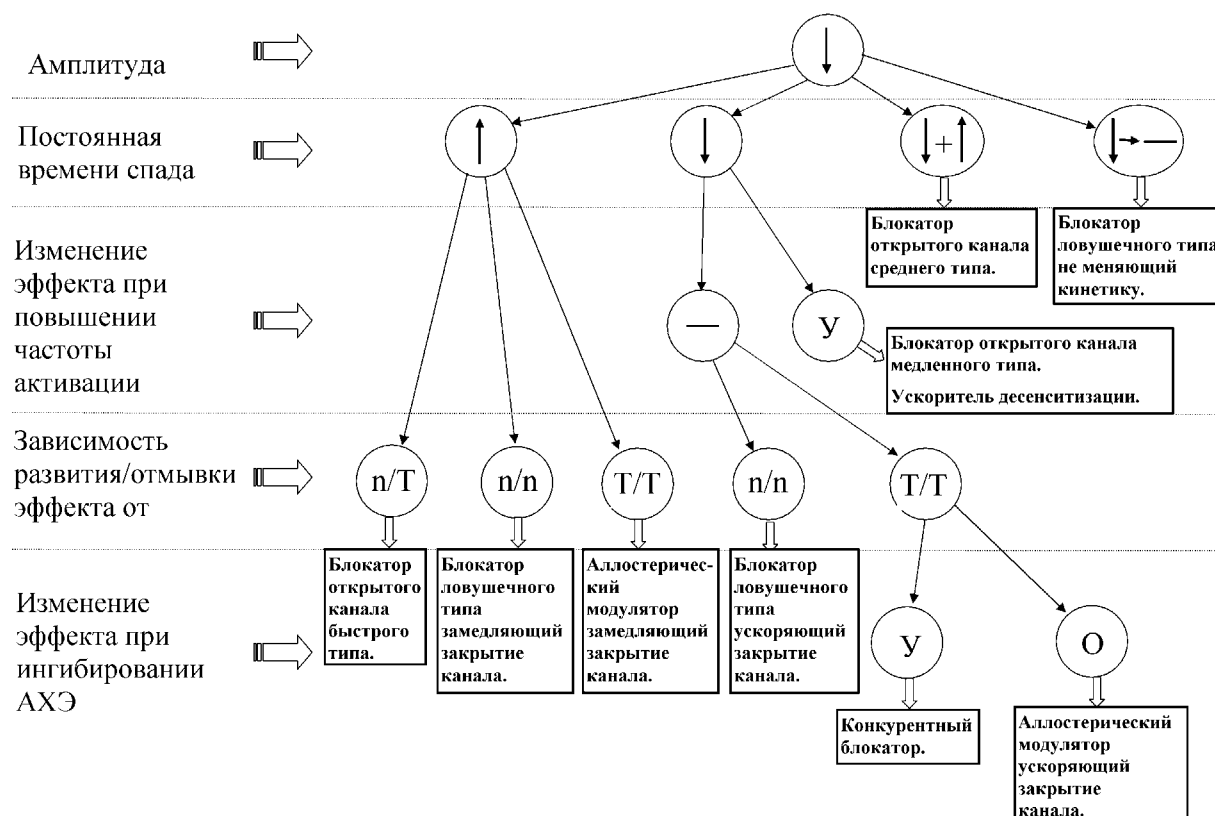


Рис. 8. Алгоритм классификации ингибирующих постсинаптический ток веществ по механизму их действия. Условные обозначения: ↓ – уменьшение параметра, ↑ – увеличение параметра, – отсутствие эффекта, y – усиление эффекта, O – ослабление эффекта, T – зависит от времени действия, n – зависит от числа активаций. ↓+↑ означает возникновение двухфазного спада с большей и меньшей постоянной, чем в контроле, ↓→ – означает временное уменьшение постоянной времени спада с последующим ее восстановлением до контрольного значения.

Следует отметить, что некоторые модуляторы имеют еще и не отмеченные в Рис. 8 особенности действия, а также то, что эффект некоторых веществ может сочетать в себе несколько механизмов действия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество веществ, способных модулировать работу лиганд-управляемых

ионных каналов, очень велико. Это связано с громадным разнообразием как типов и подтипов самих каналов, так и механизмов воздействия на них биологически активных веществ. Даже если ограничиться рассмотрением только веществ, ингибирующих постсинаптические токи, то это могут быть и блокаторы разных типов, и аллостерические модуляторы, и ускорители десенситизации. Важной разновидностью блокирования каналов является блок ловушечного типа, присущий многим широко используемым химическим соединениям, но требующий для своего выявления сочетания деполяризации и активации канала. То есть самого факта уменьшения амплитуд агонист-индуцированных токов под действием какого-то вещества недостаточно для определения механизма его действия.

В данной работе используемые для различения механизмов действия веществ модельные расчеты велись параллельно с классическими электрофизиологическими исследованиями, что нашло свое отражение в построении диссертации. Новые экспериментальные данные учитывались при моделировании, так же как модельные результаты служили для разработки новых экспериментальных протоколов. Результаты расчетов нигде не использовались как окончательное доказательство, предсказания моделей всегда сопоставлялись с разнообразными экспериментальными данными и только существенное совпадение служило основанием для представления модели в качестве научной гипотезы. Все модели строились с конкретными целями, для объяснения парадоксов, обнаруженных в экспериментах. За счет такого сочетания в исследовании обоих объектов, никотинового холинорецептора и рецептора АТФ, был достигнут существенный прогресс.

Было показано, что ганглиоблокатор мекамиламин вызывает блок ионных каналов мышечного ацетилхолинового рецептора в миотубулах крысы ( $IC_{50} = 8.1$  мкмоль при  $-70$  мВ) и в нервно-мышечном соединении лягушки ( $IC_{50} = 7.7$  мкмоль при  $-70$  мВ). Деполяризация постсинаптической мембраны в сочетании с активацией холинорецепторов экзогенным или эндогенным ацетилхолином вызывает частичное разблокирование каналов, указывая на блок каналов ловушечного типа. Ловушечный тип блокады с большей аффинностью ( $IC_{50} = 0.34$  мкмоль при  $-70$  мВ) наблюдается при действии мекамиламина на нейрональные холинорецепторы хромаффинных клеток, что свидетельствует об общем типе блокирования этим агентом никотиновых холинорецепторов разного типа. Расчет глубины зоны связывания мекамиламина в ионном канале выявил более глубокое ее расположение у нейрональных рецепторов ( $\delta = 0.72$ ) чем у мышечных ( $\delta = 0.37$ ), что свидетельствует о разном расположении структурных детерминант, определяющих блокирующий эффект мекамиламина. Математическое моделирование подтвердило, что потенциалзависимые блокирующие эффекты мекамиламина объясняются его способностью оставаться в ионном канале холинорецептора при закрытии канала, который в этом случае закрывается быстрее, чем ионный канал без блокатора.

В нервно-мышечном соединении лягушки четыре эфира 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты с растущей липофильностью вызывают уменьшение амплитуды и длительности токов концевой пластинки. Эти ингибиторные эффекты возрастают по мере роста липофильности соединений, что свидетельствует об аллостерическом действии эфиров на холинорецептор со стороны пограничного липидного слоя. Данные соединения проявляют также каналоблокирующие свойства, но не способны блокировать открытый ионный

канал по ловушечному типу. По мере роста липофильности эфиров возрастает вклад аллостерического механизма действия в общий ингибиторный эффект и замедляется кинетика блокирования открытого канала.

Антибактериальный агент хлоргексидин вызывает уменьшение амплитуды ( $IC_{50} = 4.7$  мкмоль при  $-70$  мВ) и постоянной времени спада токов концевой пластинки лягушки. Ингибиторный эффект хлоргексидина возрастает при повышении частоты раздражений двигательного нерва. На фоне развившегося эффекта хлоргексидина деполяризация постсинаптической мембраны в сочетании со стимуляцией нерва вызывает частичное разблокирование ионных каналов холинорецептора. Математическое моделирование привело к заключению о наличии двойного – аллостерического и каналоблокирующего – эффекта хлоргексидина.

Закисление среды ( $pH < 6.4$ ) вызывает противоположно направленные изменения ответов ионотропных  $P2X_2$  рецепторов клеток феохромоцитомы крыс на аппликацию низких или высоких концентраций АТФ. При концентрации АТФ  $\leq 100$  мкмоль наблюдается потенциация, а при АТФ  $\geq 1$  ммоль – депрессия токов. Депрессия сочетается со вторичной волной тока на прекращение аппликации АТФ. Анализ кинетики показал, что как потенциация, так и депрессия сопровождаются усилением сродства  $P2X_2$  рецепторов к АТФ. Поэтому при действии высоких концентраций агониста потенцирующий эффект АТФ сменяется инактивацией  $P2X_2$  рецепторов, выход из которой через открытое состояние канала вызывает вторичный токовый ответ.

Аппликация АТФ или его синтетических аналогов  $\alpha, \beta$ -meАТФ,  $\beta, \gamma$ -meАТФ и 2meS-АТФ на сенсорные нейроны крыс и мышей, экспрессирующих  $P2X_3$  рецепторы, вызывает токи, быстро десенситизирующиеся в присутствии агониста. Восстановление  $P2X_3$  рецепторов после десенситизации является медленным процессом, зависимым от природы агониста. Феномен агонист-зависимой десенситизации воспроизводится при использовании кольцевой кинетической модели, предполагающей различное сродство десенситизированных рецепторов к разным агонистам. Процесс восстановления  $P2X_3$  рецепторов после десенситизации имеет сигмоидальную зависимость от времени, что объясняется наличием нескольких промежуточных состояний рецептора на пути восстановления. Математическое моделирование показало, что именно эти промежуточные состояния лимитируют скорость восстановления рецепторов и обеспечивают сигмоидальную форму восстановления. Аппликация на сенсорные нейроны крысы подпороговых наномолярных концентраций АТФ вызывает развитие высокоаффинной десенситизации. Механизм высокоаффинной десенситизации состоит из двух компонентов: прямого перехода рецепторов в десенситизированное состояние из состояния с закрытым каналом и торможения восстановления за счет высокоаффинного связывания агониста с десенситизированными рецепторами. Высокоаффинная десенситизация может снижать чувствительность ноцицептивных сенсорных нейронов к эндогенным пуринам – медиаторам боли.

В ходе изучения механизма действия конкретных веществ на лиганд-управляемые ионные каналы были получены также результаты, имеющие принципиальное теоретическое значение – принципы различения механизмов действия ингибиторов лиганд-управляемых ионных каналов. Точное определение механизма (или – в некоторых случаях – механизмов) действия вещества имеет как

большое фундаментальное, так и важное прикладное значение. С одной стороны, именно точное знание механизма действия вещества позволяет использовать это вещество как инструмент исследования лиганд-управляемых ионных каналов. С другой стороны, точное знание механизма действия лекарственного вещества позволяет предсказать все возможные последствия его применения в различных ситуациях. Таким образом, наряду с углублением фундаментальных научных знаний о строении, механизмах функционирования и путях регуляции работы ионных каналов, полученные выводы могут быть использованы при тестировании новых препаратов для медицинской практики.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен систематический анализ молекулярных механизмов действия вызывающих депрессию постсинаптического тока веществ, некоторые из которых (мекамиламин, димефосфон, хлоргексидин) применяются в клинической практике. Показано, что депрессия постсинаптического тока вследствие ингибирования ионотропных холинорецепторов и рецепторов АТФ реализуется путем усиления их десенситизации или рН-зависимой инактивации, аллостерической модуляцией через сайты, доступные из водной или липидной фазы, конкурентной блокадой или блокадой ионных каналов.

2. Анализ кинетической схемы, разработанной на основе полученных экспериментальных данных, показал, что мекамиламин является блокатором ловушечного типа ионных каналов холинорецепторов и способен ускорять закрытие канала при нахождении внутри него.

3. Сопоставление экспериментальных данных и результатов математического моделирования показало, что в основе угнетающего постсинаптического действия эфиров 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты и хлоргексидина лежит двойной механизм, включающий аллостерическое и каналоблокирующее действие на ионотропные холинорецепторы.

4. Сопоставление экспериментальных и модельных данных позволило показать, что двойной – потенцирующий и ингибирующий – эффект рН на  $P2X_2$  объясняется повышением сродства рецепторов к АТФ во всех местах его присоединения.

5. Сопоставление экспериментальных данных и результатов математического моделирования показало, что особенности эффектов агонистов пуриновых рецепторов  $P2X_3$  типа (чувствительность к агонисту, скорость восстановления после десенситизации, высокоаффинная десенситизация) обусловлены в основном разной скоростью их диссоциации от рецептора.

6. Математическое моделирование кинетики взаимодействия рецепторов с агонистами и ингибиторами показало, что каждый из исследованных механизмов ингибирования (конкурентная блокада, каналоблокада, аллостерическая модуляция, ускорение десенситизации) имеет свои характерные особенности в отношении влияния на основные характеристики постсинаптических токов. Для однозначной классификации ингибирующих постсинаптический ток веществ по молекулярному механизму их действия необходимо учитывать: направление и величину изменения под действием ингибитора постоянной времени спада агонист-индуцированных токов; зависимость развития изменений и скорости отмывки эффекта вещества от длительности его воздействия, количества активаций и частоты активации рецепторов; наличие и условия возникновения ситуаций



временного восстановления рецепторов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации.

#### Статьи в журналах.

1. Котов, Н.В. Моделирование кальцийзависимых ферментативных реакций / Н.В. Котов, **А.И. Скоринкин**, Е.К. Костылева // Журнал физической химии.- 1995.- Т. 69.- № 8.- С. 1438-1444.
2. Скоринкин, А.И. Моделирование двух волн ответа АТФ-рецепторов клеток феохромоцитомы на скачок концентрации агониста / А.И. Скоринкин, Р.А. Гиниатуллин // Биофизика.- 2000.- Т. 45.- № 2.- С. 293-298.
3. Giniatullin, R.A. Rapid relief of block by mecamylamine of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells in vitro: An electrophysiological and modeling study / R.A. Giniatullin, E.M. Sokolova, S. Di Angelantonio, **A. Skorinkin**, M.V. Talantova, A. Nistri // Molec. Pharm.- 2000.- V. 58.- № 4.- P. 778-787.
4. Пряжников, Е.Г. Механизмы действия димефосфона на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении / Е.Г. Пряжников, **А.И. Скоринкин**, Р.С. Гараев, Р.А. Гиниатуллин // Нейрофизиология / Neurophysiology.- 2002.- Т. 34.- № 5.- С. 635-641.
5. Хабибуллина, Н.К. Модулирующее действие серотонина на нервно-мышечную передачу лягушки / Н.К. Хабибуллина, А.В. Шакирзянова, **А.И. Скоринкин**, Р.А. Афзалов, Р.А. Гиниатуллин // Бюлл. эксп. биол. мед.- 2002.- Т. 134.- № 7.- С. 12-15.
6. Skorinkin, A. Bimodal action of protons on ATP currents of rat PC12 cells / A. Skorinkin, A. Nistri, R. Giniatullin // J. Gen. Physiol.- 2003.- V. 122.- № 1.- P. 33-44.
7. Sokolova, E. Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X3 receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation / E. Sokolova, **A. Skorinkin**, E. Fabretti, L. Masten, A. Nistri, R. Giniatullin // Brit. J. Pharm.- 2004.- V. 141.- № 6.- P. 1048-1058.
8. Fabbro, A. Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells / A. Fabbro, **A. Skorinkin**, M. Grandolfo, A. Nistri, R. Giniatullin // J. Physiol.- 2004.- V. 560.- № 2.- P. 505-517.
9. Скоринкин, А.И. Реконструкция динамики изменения концентрации ацетилхолина в синаптической щели при одноквантовом сигнале / А.И. Скоринкин, А.Р. Шайхутдинова // Биофизика.- 2004.- Т. 49.- № 5.- С. 872-876.
10. Скоринкин, А.И. Ловушечный тип блокирования мышечных никотиновых холинорецепторов мекамиламином / А.И. Скоринкин, К.Б. Остроумов, А.Р. Шайхутдинова, Р.А. Гиниатуллин // Доклады Академии Наук.- 2004.- Т. 399.- № 6.- С. 843-845.
11. Скоринкин, А.И. Зависимость концентрации полумаксимального действия блокатора открытых каналов от концентрации агониста / А.И. Скоринкин, Н.В. Валеев, А.Р. Шайхутдинова // Биофизика.- 2005.- Т. 50.- № 2.- С. 281-288.
12. Пряжников, Е.Г. Механизмы действия производных 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении / Е.Г. Пряжников, **А.И. Скоринкин**, Р.С. Гараев, Р.А. Гиниатуллин, А.О. Визель, Л.И. Щукина // Бюлл. эксп. биол. мед.- 2005.- Т. 139.- № 4.- С. 432-435.
13. Шайхутдинова, А.Р. Механизмы модуляции работы рецепторно-канального комплекса хлоргексидином / А.Р. Шайхутдинова, Е.Е. Никольский,

Р.А. Гиниатуллин, **А.И. Скоринкин** // Доклады Академии Наук.- 2005.- Т. 402.- № 3.- С. 427-429.

14. Скоринкин, А.И. Действие ганглиоблокатора мекамиламина на мышечные ионотропные холинорецепторы крыс / А.И. Скоринкин // Нейрофизиология / Neurophysiology.- 2005.- Т. 37.- № 3.- С. 217-222.

15. Sundukova, M.V. Inhibition of water transport across cell membranes by dimephosphon / M.V. Sundukova, A.R. Mutina, **A.I. Skorinkin** // MRSej.- 2006.- Vol. 8.- № 1.- P. 6-9.

16. Sokolova, E. Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors / E. Sokolova, **A. Skorinkin**, I. Moiseev, A. Agrachev, A. Nistri, R. Giniatullin // Molec. Pharm.- 2006.- Vol. 70.- № 1.- P. 373-382.

17. Ostroumov, K. Modeling study of mecamlamine block of muscle type acetylcholine receptors / K. Ostroumov, A. Shaikhutdinova, **A. Skorinkin** // Eur. Biophys. J.- 2007.- in press.

#### **Статьи в сборниках.**

1. Скоринкин, А.И. Модельное определение изменения концентрации ацетилхолина в синаптической щели / А.И. Скоринкин // Компьютерное и математическое моделирование в естественных и технических науках: Вып. 1.- Тамбов: изд-во ТГУ, 2001.- С. 20-22.

2. Остроумов, К.Б. Моделирование действия верапамила на ацетилхолиновые рецепторы нервно-мышечного синапса лягушки / К.Б. Остроумов, Э.Р. Шарифуллина, **А.И. Скоринкин** // Компьютерное и математическое моделирование в естественных и технических науках: Вып. 18.- Тамбов: изд-во ТГУ, 2002.- С. 12.

3. Скоринкин, А.И. Критерии различения механизмов ингибирования постсинаптических токов / А.И. Скоринкин, Р.А. Гиниатуллин // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XI: Часть II.- 2004.- С. 180-183.

4. Шайхутдинова, А.Р. Механизмы модуляции работы рецепторно-канального комплекса хлоргексидином биглюконатом / А.Р. Шайхутдинова, Е.Е. Никольский, Р.А. Гиниатуллин, **А.И. Скоринкин** // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XI: Часть II.- 2004.- С. 195-198.

5. Стробыкина, О.С. Изучение методом ИК-спектроскопии мембранотропного действия хлоргексидина биглюконата / О.С. Стробыкина, Д.А. Файзуллин, **А.И. Скоринкин** // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XII: Часть II.- 2005.- С. 229-232.

6. Абдуллин, А.Р. Исследование механизма различного влияния блокатора открытых каналов на параметры токов, вызванных высокой и низкой концентрациями агониста / А.Р. Абдуллин, **А.И. Скоринкин** // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XIII.- 2006.- С. 3-6.

7. Скоринкин, А.И. Исследование протон-активируемых ионных каналов клеток PC12 / А.И. Скоринкин, А.Р. Шайхутдинова, А. Нистри, Р.А. Гиниатуллин // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XIII.- 2006.- С. 249-252.

8. Сундукова, М.В. ЯМР-исследование водной проницаемости мембран эритроцитов / М.В. Сундукова, А.Р. Мутина, **А.И. Скоринкин** // Структура и динамика молекулярных систем: Сборник статей: Выпуск XIII.- 2006.- С. 285-288.

#### **Тезисы основных докладов.**

1. Скоринкин, А.И. Моделирование постсинаптических процессов / А.И. Скоринкин // Актуальные проблемы нейробиологии: V Всероссийская школа молодых учёных: Тезисы пленарных докладов и стендовых сообщений.- Казань: КГМУ, 1998.- С. 58-59.
2. Остроумов, К.Б. Оценка вероятности связывания блокатора в открытом канале / К.Б. Остроумов, **А.И. Скоринкин** // Актуальные проблемы нейробиологии: VI Всероссийская школа молодых учёных: Тезисы пленарных докладов и стендовых сообщений.- Казань: КГМУ.- 1999.- С. 95-96.
3. Скоринкин, А.И. Влияние мекамиламина на скорость открывания ионного канала / А.И. Скоринкин, К.Б. Остроумов // Растущий организм: Адаптация к физической и умственной нагрузке: Тезисы V Всероссийского симпозиума и школы семинара молодых учёных и учителей.- Казань: Унипресс, 2000.- С. 130-131.
4. Скоринкин, А.И. Зависимость амплитуды установившихся ответов от концентрации агониста и блокатора при последовательной кинетике активации и блокирования / А.И. Скоринкин // Четвёртая международная конференция по математическому моделированию: Тезисы докладов.- Москва: Издательство «Станкин», 2000.- С. 102.
5. Скоринкин, А.И. Реконструкция динамики изменения концентрации ацетилхолина в синаптической щели при одноквантовом сигнале / А.И. Скоринкин // Четвёртая международная конференция по математическому моделированию: Тезисы докладов.- Москва: Издательство «Станкин», 2000.- С. 103.
6. Skorinkin, A. Computer modeling of ACh time-course in synaptic cleft / N. Valeev, A. Skorinkin, R. Giniatullin // Eur. Bioph. J.- 2000.- V. 29.- № 4-5.- P. 350.
7. Ostroumov, K.B. Qualitative analysis of action of mecamlamine on neuronal acetylcholine receptors (nAChRs) on sciatic nerve-sartorius muscle preparation of the frog / K.B. Ostroumov, **A.I. Skorinkin**, R.A. Giniatullin // Актуальные проблемы нейробиологии: VII Всероссийская школа молодых учёных: Тезисы пленарных докладов и стендовых сообщений.- Казань: КГМУ, 2000.- С. 78.
8. Sokolova, E.M. How can mecamlamine block nicotinic receptors? / E.M. Sokolova, R.A. Giniatullin, S. Di Angelantonio, M.V. Talantova, **A.I. Skorinkin**, A. Nistri // Synaptic transmission: 100 years after L. Luciani.- Rome, 2000.- P. 109-110.
9. Skorinkin, A.I. Computational modelling of mecamlamine action on neuronal nicotinic receptors / A.I. Skorinkin, R.A. Giniatullin // Нейрофизиология / Neurophysiology.- 2000.- Т. 32.- № 3.- С. 231.
10. Skorinkin, A.I. Modelling of two-waves ATP-induced currents / A.I. Skorinkin, R.A. Giniatullin, K.B. Ostroumov // Нейрофизиология / Neurophysiology.- 2000.- Т. 32.- № 3.- С. 265.
11. Остроумов, К.Б. Моделирование действия АТФ на P2X рецепторы клеток PC12 / К.Б. Остроумов, **А.И. Скоринкин**, Р.А. Гиниатуллин // XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: Тез. докл.- 2001.- С. 182.
12. Скоринкин, А.И. Сравнение трех возможных схем блокирования открытого канала / А.И. Скоринкин // XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: Тез. докл.- 2001.- С. 226.
13. Шайхутдинова, А.Р. Влияние хлоргексидина на функциональное состояние периферического нервно-мышечного аппарата / А.Р. Шайхутдинова, **А.И. Скоринкин**, Е.Е. Никольский, Р.А. Гиниатуллин // Растущий организм: Адаптация

к физической и умственной нагрузке: Тезисы VI Всероссийского научного симпозиума.- 2002.- С. 176-177.

14. Priazhnikov, E.G. The regularities of blocking of acetylcholine receptor ion channel by oxaphospholene derivatives / E.G. Priazhnikov, **A.I. Skorinkin**, R.S. Garaev, R.A. Giniatullin // International symposium "Synaptogenesis", Vienna, 5-7 July 2003, P. 29.

15. Priazhnikov, E.G. The blocking of acetylcholine receptor ion channel by oxaphospholene derivatives / E.G. Priazhnikov, R.A. Giniatullin, **A.I. Skorinkin** // EJB.- 2003.- V. 270.- Supplement 1.- P. 223.

16. Skorinkine, A. Bimodal action of protons on ATP currents of rat PC12 cells / A. Skorinkine, A. Nistri, R. Giniatullin // EJB.- 2003.- V. 270.- Supplement 1.- P. 225.

17. Скоринкин, А.И. Модуляция коротких токов, индуцированных АТФ, протонами и ионами цинка / А.И. Скоринкин, А. Нистри, Р.А. Гиниатуллин // III Съезд биофизиков России: Тезисы докладов: Том I.- 2004.- С. 289-290.

18. Шайхутдинова, А.Р. Моделирование процесса взаимодействия хлоргексидина биглюконата с постсинаптическими никотиновыми холинорецепторами / А.Р. Шайхутдинова, **А.И. Скоринкин**, Е.Е. Никольский // III Съезд биофизиков России: Тезисы докладов: Том I.- 2004.- С. 304-305.

19. Скоринкин, А.И. Критерии различия механизмов ингибирования постсинаптических токов / А.И. Скоринкин, Р.А. Гиниатуллин // III Съезд биофизиков России: Тезисы докладов: Том I.- 2004.- С. 378-379.

20. Пряжников, Е.Г. Двойной механизм блокады никотинового холинорецептора производными 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты / Е.Г. Пряжников, **А.И. Скоринкин**, Р.С. Гараев, Р.А. Гиниатуллин, А.О. Визель, Л.И. Щукина // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.- 2004.- Т. 90.- № 8.- С. 219.

21. Скоринкин, А.И. Действие ганглиоблокатора мекамиламина на нервномышечную передачу тепловых / А.И. Скоринкин, А. Нистри, Р.А. Гиниатуллин // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.- 2004.- Т. 90.- № 8.- С. 280.

22. Соколова, Е.М. Агонистзависимое восстановление после десенситизации P2X3 рецепторов сенсорных нейронов / Е.М. Соколова, **А.И. Скоринкин**, И.Е. Моисеев, А.А. Аграчев, А. Нистри, Р.А. Гиниатуллин // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.- 2004.- Т. 90.- № 8.- С. 281.

23. Шайхутдинова, А.Р. Механизм модуляции работы никотинового рецепторно-канального комплекса хлоргексидином биглюконатом / А.Р. Шайхутдинова, **А.И. Скоринкин**, Е.Е. Никольский // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.- 2004.- Т. 90.- № 8.- С. 287.

24. Скоринкин, А.И. Механизмы ингибирования постсинаптических токов / А.И. Скоринкин // Актуальные проблемы нейробиологии: Тезисы лекций.- Казань: КГМУ.- 2005.- С. 14-16.

25. Скоринкин, А.И. Механизмы модуляции ионотропных рецепторов ацетилхолина и АТФ / А.И. Скоринкин // XX Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: Тез. докл.- 2007.- С. 417.